



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο ρόλος των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNA) στην υπογονιμότητα»**

**ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ ΚΑΡΚΑΛΕΤΣΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΤΖΕΖΟΥ Α. (Επιβλέπουσα)**

**ΤΡΑΧΑΝΑ Β. (Μέλος)**

**ΔΗΜΑΣ Κ. (Μέλος)**

**ΛΑΡΙΣΑ, ΕΤΟΣ 2017**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«MICRO-RNA AND INFERTILITY»**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπογονιμότητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα του σύγχρονου Δυτικού Κόσμου, το οποίο απασχολεί περίπου 1 στα 6 ζευγάρια , με συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά και πολύ σημαντικές κοινωνικοοικονομικές συνέπειες. Πολλοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη αναπαραγωγικών προβλημάτων σε άνδρες και γυναίκες, με τους σημαντικότερους από αυτούς να αφορούν σε γενετικά και επιγενετικά αίτια και διαφοροποιημένη μεταμεταφραστική ρύθμιση. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρείται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των παραπάνω παραγόντων, με ιδιαίτερη έμφαση στα ως τώρα δεδομένα γύρω από την επίδραση της διαφοροποιημένης έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs (micro RNAs) στη λειτουργία του γυναικείου και ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος σε άτομα με προβλήματα γονιμότητας καθώς και την πιθανή τους χρήση ως διαγνωστικούς βιοδείκτες.

## **ABSTRACT**

Infertility is one of the most important problems of the modern Western World, which employs about 1 in 6 couples, with increasing rates and very significant socio-economic consequences. Many factors have been associated with the development of reproductive problems in males and females, the most important of which concern genetic and epigenetic causes and differentiated post-translational regulation. In this thesis, it is attempted a literature review of the above factors, with particular emphasis on the current data on the effect of differentiated expression of small non-coding RNAs (micro RNAs) on the function of the female and male reproductive system in people with fertility problems and their possible use as diagnostic biomarkers.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
---------------	---

ABSTRACT.....	4
---------------	---

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ micro RNAs.....	8
1.1.1 Η βιογένεση των μικρών μη κωδικών RNAs.....	9
1.1.2 Η αναγνώριση του mRNA-στόχου.....	11
1.1.3 Αποσιώπηση γονιδίων μέσω των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs.....	12
1.1.4 Η χρησιμότητα των μικρών μη κωδικών μορίων στη διάγνωση ασθενειών.....	15
1.1.5 Κυκλοφορόντα μικρά μη κωδικά μόρια RNA.....	15
1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΗ ΚΩΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA.....	17
1.3 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ.....	18

2. ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	21
-------------------------------	----

2.1 Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	22
2.2 ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΙΤΙΕΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ	
2.2.1 Χρωμοσωματικές ανωμαλίες.....	24
2.2.2 Γονιδιακές βλάβες.....	25
2.2.3 Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στην ανδρική υπογονιμότητα.....	28
2.2.4 Micro-RNAs και σπερματογένεση.....	29
2.2.5 Μεταβολές στο προφίλ έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs σε άνδρες με υπογονιμότητα.....	35
2.3 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNAs ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	40

<b>3. ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....</b>	<b>43</b>
3.1 ΩΟΓΕΝΕΣΗ.....	44
3.2 ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	46
3.2.1 Χρωμοσωματικές ανωμαλίες .....	46
3.2.2 Γονιδιακές μεταλλάξεις.....	46
3.2.3 Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στη γυναικεία υπογονιμότητα.....	48
3.2.4 Τα MicroRNAs και η ωοθηκική λειτουργία.....	48
3.3 ΤΑ Micro RNAs ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	52
3.3.1 Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovary Syndrome – PCOS)....	52
3.3.2 Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (Premature ovarian failure –POF).....	56
3.4 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΕΜΒΡΥΟΥ.....	58
3.4.1 Τα miRNAs στην ενεργοποίηση της βλαστοκύστης.....	59
3.4.2 Το ενδομήτριο.....	61
3.4.3 Επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης.....	62
3.4.4 Ενδομητρίωση.....	63
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>65</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>67</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας σημαντικός αριθμός ζευγαριών, περίπου ένα στα έξι, αντιμετωπίζει προβλήματα σύλληψης και βιώνει τη δύσκολη εμπειρία μιας ή περισσότερων αποβολών. Γνωρίζουμε σήμερα ότι πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στη δημιουργία προβλημάτων αναπαραγωγής. Μεταξύ αυτών, σημαντικοί είναι οι γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν κυρίως χρωμοσωματικές ανωμαλίες, γονιδιακές βλάβες, πολυμορφισμούς γενετικών τόπων καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις (μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ιστονών), οι οποίες δύναται να συνδέονται με την ανδρική στειρότητα (ολιγοσπερμία, αζωοσπερμία, ασθενοσπερμία κ.α.), την γυναικεία στειρότητα (πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής αμηνόρροια), τις καθ' έξιν αποβολές και τη δυσκολία εμφύτευσης του εμβρύου κατά τα πρώτα στάδια της κύησης. Στα μέχρι τώρα δεδομένα σχετικά με τα αίτια της ανδρικής και γυναικείας υπογονιμότητας, έρχεται να προστεθεί μια καινούρια ομάδα μικρών μη κωδικών RNA, τα micro-RNAs. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η περιγραφή του μηχανισμού δράσης των micro-RNAs στη φυσιολογική λειτουργία του ανδρικού και γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, καθώς και στα πρώτα στάδια εμφύτευσης του εμβρύου και τις μεταβολές που παρουσιάζονται σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με υπογονιμότητα. Επίσης θα αναλυθεί ο ρόλος συγκεκριμένων micro-RNA που έχουν συσχετισθεί με την ανδρική ή/και γυναικεία υπογονιμότητα. Επιπρόσθετα, θα συζητηθεί η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν αυτά τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA ως προγνωστικοί βιοδείκτες υπογονιμότητας καθώς και η πιθανότητα χρήσης τους ως θεραπευτικά μόρια.

## 1.1 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ *micro RNAs*

Τα *micro RNAs* είναι μικρά, μονόκλωνα RNAs, τα οποία αποτελούνται από 21-25 νουκλεοτίδια. Παράγονται από πρόδρομες δομές σε σχήμα φουρκέτας, οι οποίες λαμβάνουν την τελική τους διαμόρφωση έπειτα από την επίδραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs συμμετέχουν σχεδόν σε όλες τις ζωικές και φυτικές βιολογικές διεργασίες που αφορούν στην κυτταρική διαφοροποίηση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση. Διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο, ο οποίος επιτυγχάνεται είτε μέσω της αποδόμησης των m-RNA, είτε μέσω καταστολής της μετάφρασής τους, ενώ εκτιμάται ότι κάθε μόριο *micro-RNA* σχετίζεται με τη ρύθμιση εκατοντάδων διαφορετικών m-RNAs (Ambros και συν., 2003).

Η αρχή για την μελέτη των *micro RNAs* έγινε το 1993 με την ανακάλυψη του *lin-4 RNA* στον *Caenorhabditis elegans* (Reinhart και συν., 2000). Από τότε, πλήθος μελετών έχει ασχοληθεί με τον χαρακτηρισμό των *mi RNAs* και των υπεύθυνων γονιδίων για την κωδικοποίησή τους. Επιπλέον, μελέτες εξελικτικής βιολογίας έδειξαν ότι αρκετά *miRNAs* είναι εξαιρετικά συντηρημένα φυλογενετικά. Αξίζει να σημειωθεί, ότι περισσότερα από τα μισά *miRNAs* στον *C.elegans* εμφανίζουν ομολογία με *miRNAs* του ανθρώπου (Kim και συν., 2009).

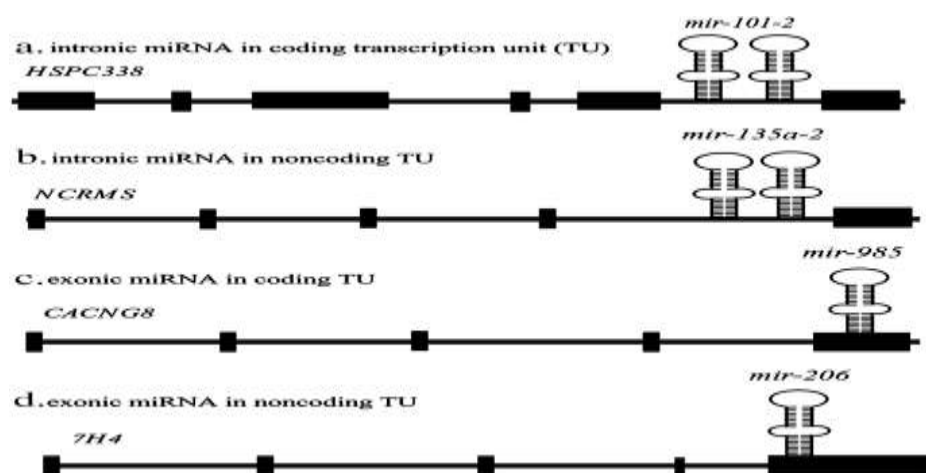
Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο περισσότερα από χίλια *micro RNAs*, τα οποία, όπως έχει αποδειχθεί, ρυθμίζουν πάνω από το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (Sayed και συν., 2011). Όταν, η ύπαρξη ενός μοναδικού μικρού μη κωδικού μορίου RNA εξακριβωθεί πειραματικά, αυτό εκχωρείται στη βάση *miRBase Registry*, με μια μοναδική ονομασία, όπως αυτή ορίζεται με βάση τους κανόνες ονοματολογίας. Σύμφωνα με αυτούς, ένα ώριμο *micro RNA* ονομάζεται ως "*miR*" ακολουθούμενο από έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης π.χ. *miR-1*, *miR-2* κ.λπ., ενώ η αντίστοιχη πρόδρομη μορφή του χαρακτηρίζεται ως "*mir*". Η προέλευση του *micro RNA* προσδιορίζεται με ένα πρόθεμα τριών γραμμάτων π.χ. το *miR-1* του *Homo sapiens* αναφέρεται ως *hsa-miR-1*<sup>21</sup>. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από την προσθήκη ενός γράμματος ή ενός αριθμού στο τέλος του ονόματος, για τη διάκριση ανάμεσα σε παρόμοιες ή ταυτόσημες αλληλουχίες, αντίστοιχα. Έτσι, το *miR-15a* και το *miR-15b* έχουν ταυτόσημα 5' άκρα αλλά διαφέρουν κατά 4 νουκλεοτίδια στις 3' περιοχές. Αντίθετα, τα *miR-16-1* και *miR-16-2* έχουν απολύτως



ίδιες αλληλουχίες αλλά τα γονίδια τους εντοπίζονται σε δυο διαφορετικά χρωμοσώματα, το χρωμόσωμα 13 και το χρωμόσωμα 3, αντίστοιχα . Επιπρόσθετα, είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται από ποια αλυσίδα της πρόδρομης μορφής προέρχεται το ώριμο micro RNA, έτσι το miR-1-5p προέρχεται από το 5' άκρο του pri-miRNA ενώ το miR-1-3p από το 3' άκρο του). (miRBase Registry).

### 1.1.1 Η βιογένεση των μικρών μη κωδικών RNAs

Η πλειοψηφία των miRNAs κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε συστάδες (clustered genes) και τα οποία εντοπίζονται είτε ανάμεσα σε γονίδια είτε σε περιοχές ιντρονίων. Μια μικρή μειοψηφία των miRNAs γονιδίων βρίσκεται διάσπαρτη στο γονιδίωμα. Τα γονίδια σε συστάδες συνήθως μοιράζονται τον ίδιο υποκινητή και εκφράζονται σαν poly-cistronic πρωτογενή μετάγραφα. Σε λίγες περιπτώσεις, μεταγράφονται από δικό τους υποκινητή ως mono-cistronic πρωτογενή μετάγραφα. Ανάλογα με την γενωμική τους θέση, τα miRNAs γονίδια μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κατηγορίες; intronic miRNAs σε κωδικές περιοχές( coding transcription units- TU), intronic miRNAs σε μη κωδικές περιοχές, exonic miRNAs σε κωδικές TU και exonic miRNAs σε μη κωδικές TU<sup>4</sup> (εικόνα 1) (Wahid και συν., 2010).



**Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής και οργάνωσης των γονιδίων miRNAs.**

Η φουρκέτα απεικονίζει τα miRNA stem loops και τα κουτιά δείχνουν τις περιοχές των εξωνίων..

(Wahid και συν., MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function and recent clinical trials, 2010)

Η βιογένεση των μικρών μη κωδικών RNAs ακολουθεί διάφορα μονοπάτια, τα οποία, σε γενικές γραμμές, διαιρούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: το κανονικό (canonical) και το εναλλακτικό (alternative) μονοπάτι.

Στο κανονικό μονοπάτι, η μεταγραφή των miRNA γονιδίων πραγματοποιείται από την RNA-pol II ή την RNA-pol III (Wahid και συν., 2010). Αρχικά παράγεται ένα πρόδρομο μόριο με μορφή φουρκέτας που ονομάζεται pri-miRNA, το οποίο αποτελείται από χιλιάδες νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει 5'καλύπτρα και 3' poly(A) ουρά. Το pri-miRNA μεθυλιώνεται από τη μεθυλοτρανφεράση METTL3. Η μεθυλίωση αυτή μαρκάρει το παραπάνω μόριο προκειμένου να αναγνωριστεί από την πρωτεΐνη DGCR8 (Alarcon και συν., 2015). Το pri-miRNA κόβεται, κάτω από την επίδραση του συμπλόκου της ενδονουκλεάσης DROSHA και της DGCR8 (DiGeorge critical region in gene 8), παράγοντας μια καινούρια πρόδρομη δομή που ονομάζεται pre-miRNA (60-70 νουκλεοτίδια) και έχει σχήμα φουρκέτας με 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' τελικό άκρο του (Wahid και συν., 2010). Όλη η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσα στον πυρήνα.

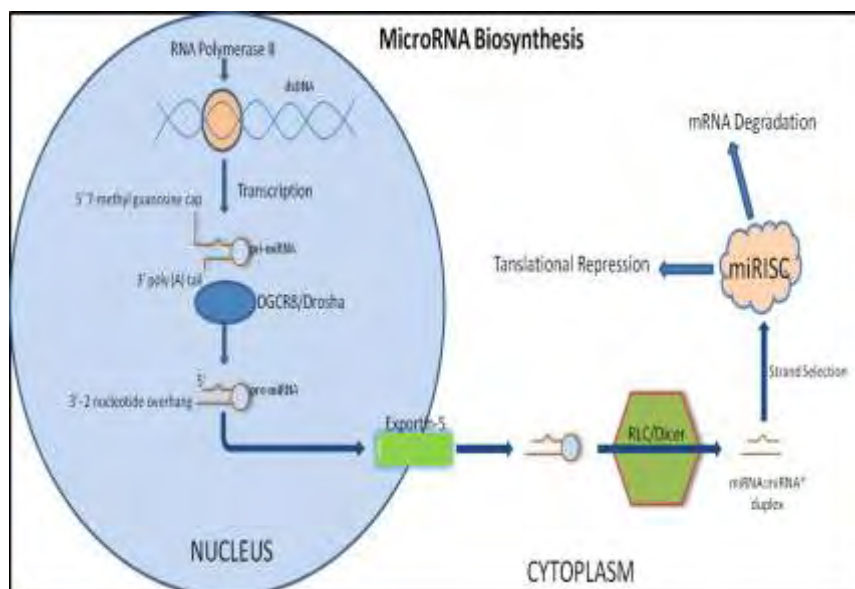
Στο εναλλακτικό μονοπάτι, η παραγωγή του pre-miRNA είναι ανεξάρτητη του συμπλόκου DROSHA/DGCR8 (Havens και συν., 2012). (Εικόνα 2)

Τα pre-miRNAs μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα, μέσω των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης exportin-5 (EXP-5) (Lund και συν., 2004). (Εικόνα 2)

Στο κυτταρόπλασμα το pre-miRNAs αποδεσμεύεται από την exportin-5. Κατόπιν, δέχεται τη δράση της ενδονουκλεάσης DICER, η οποία κόβει το pre-miRNA σε μια περιοχή, η οποία εντοπίζεται 22 νουκλεοτίδια πριν το τελικό άκρο, για να παραχθεί ένα ώριμο δίκλωνο μόριο miRNA (Wahid και συν., 2010). Η ανθρώπινη DICER φαίνεται να συνεργάζεται με ακόμη δύο πρωτεΐνες, την TRBP (trans-activation response RNA-binding protein) και την πρωτεϊνική κινάση PRKRA (interferon-inducible doublestranded RNA-dependent activator) (Chendrimada και συν., 2005).

Στη συνέχεια, το δίκλωνο γραμμικό μόριο miRNA αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες (Ago family protein complex), όπου και πραγματοποιείται αποδόμηση της μίας αλυσίδας του δίκλωνου RNA ενώ η άλλη αλυσίδα παραμένει συνδεδεμένη με το σύμπλοκο RISC (αποτελείται από τις Dicer-TRBT ή PRKRA-Ago family complex) (Chendrimada και συν., 2005). (Εικόνα 2)

Με αυτή τη μορφή το ώριμο, μονόκλωνο πια, microRNA οδηγείται στο mRNA-στόχο και επιτυγχάνει την αποσιώπηση του είτε μέσω αποδόμησης είτε μέσω αναστολής της μετάφρασης (Kim και συν., 2009).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του κανονικού μονοπατιού βιογένεσης των microRNA (miRNA). (Baley j., Julang Li. MicroRNAs and ovarian function. Journal of Ovarian Research 2012,5:8)

### 1.1.2 Η αναγνώριση του mRNA-στόχου

Τα μικρά μη κωδικά RNAs των ζώων αναγνωρίζουν περιοχές στο 3' τελικό άκρο των mRNA-στόχων με βάση των κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται με τη διαμεσολάβηση της αλυσίδας-οδηγού και ειδικότερα μέσω της αλληλεπίδρασης των νουκλεοτιδίων 2-8 του miRNA με την συμπληρωματική περιοχή του mRNA στόχου. Η περιοχή αυτή είναι γνωστή και ως "seed region". Η κεντρική περιοχή του micro RNA, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 9-12, συνήθως, είναι προεξέχουσα, γεγονός που δεν επιτρέπει την ενδονουκλεοτιδική επίδραση των πρωτεϊνών Αργοναυτών στο ίδιο το miRNA, παρόλα αυτά, καθορίζει τη θέση διάρρηξης (cleavage) του mRNA-στόχου, στην περίπτωση αποδόμησης του. Η 3' τελική περιοχή των miRNAs θεωρείται πιο επιρρεπής σε λάθη συμπληρωματικότητας (Giannouli και συν., 2012). (Εικόνα 3)

Σε σχέση με τη διαδικασία αναγνώρισης του mRNA στόχου έχουν προταθεί δύο μοντέλα. Το πρώτο ονομάζεται *“two-state model”* και θεωρεί ότι το 5' άκρο του miRNA αναγνωρίζει μία προσβάσιμη περιοχή στο 3' UTR του mRNA-στόχου, προκαλώντας αποδιοργάνωση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής και δημιουργία ενός σταθερού συμπλόκου mRNA/miRNA. Το δεύτερο μοντέλο, το οποίο ονομάζεται *“fixed end model”*, προτείνει ότι και τα δύο άκρα της οδηγού αλυσίδας του miRNA συνδέονται με το mRNA και παραμένουν στενά συνδεδεμένα με αυτό σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αναγνώρισης του στόχου (Giannouli και συν., 2012).

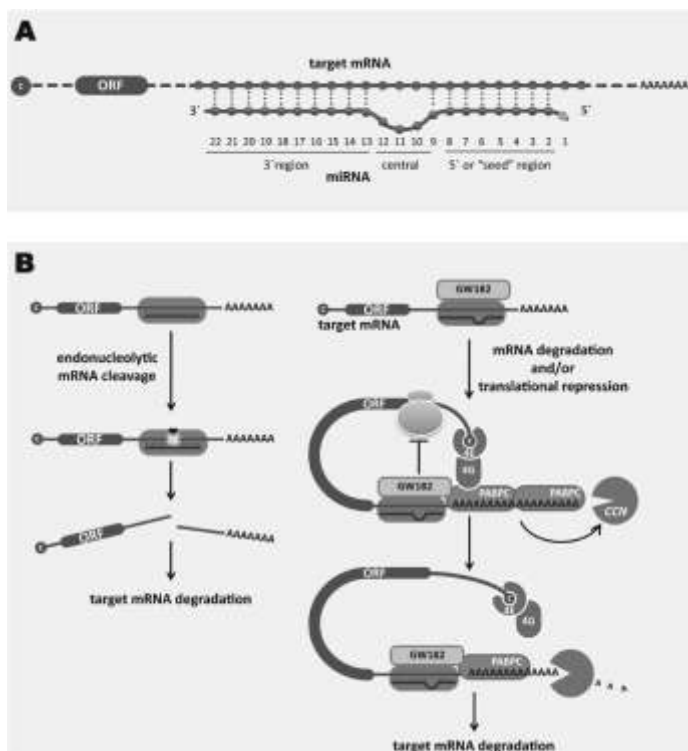
Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αλγόριθμοι πρόβλεψης προκειμένου να εντοπιστούν οι πιθανοί στόχοι των micro RNAs. Οι αλγόριθμοι αυτοί βασίζονται στην αντιστοίχιση της *‘seed region’* με αλληλουχίες των πιθανών mRNA στόχων, στη γενική συμπληρωματικότητα και στη σταθερότητα του συμπλόκου miRNA/mRNA-στόχος, στην εξελικτική συντηρητικότητα της περιοχής στόχου καθώς και στο περιεχόμενο των UTR του mRNA στόχου (Bartel και συν., 2009).

### 1.1.3 Αποσιώπηση γονιδίων μέσω των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs

Προκειμένου να επιτευχθεί ο ρυθμιστικός ρόλος των micro RNAs στις διάφορες κυτταρικές διεργασίες, τα miRNAs συνεργάζονται με την πρωτεϊνική οικογένεια των Αργοναυτών (AGO family proteins), διαμορφώνοντας το βασικό πυρήνα του συμπλέγματος miRISCs (miRNA-induced silencing complexes). Οι πρωτεΐνες AGOs περιλαμβάνουν τρεις εξελικτικά συντηρημένους τομείς: τον τομέα PAZ, τον τομέα MID και τον τομέα PIWI. Η περιοχή PAZ συνδέεται με το 3' άκρο του RNA οδηγού, ενώ το σημείο επαφής MID και PIWI συνδέεται με το 5' άκρο του miRNA. Μετά την πρόσδεση των AGOs στα miRNAs αυτά σταθεροποιούνται και αυξάνεται ο χρόνος ημίσειας ζωής τους σε σχέση με τα άλλα RNAs (περισσότερες από 14 ώρες) (Giannouli και συν., 2012).

Το σύμπλεγμα miRISCs διαμεσολαβεί στη μεταμεταταφραστική αποσιώπηση των mRNAs μέσω νουκλεοτιδικών ακολουθιών, οι οποίες είναι είτε μερικώς είτε ολικώς συμπληρωματικές με τα mRNA-στόχους. Οι στόχοι με ολική συμπληρωματικότητα διασπώνται από τις καταλυτικά ενεργές AGOs, ενώ η μερική συμπληρωματικότητα αποτρέπει την ενζυματική δράση των AGOs. Σε αυτήν την περίπτωση, κατά την οποία δεν είναι δυνατή η απευθείας αποδόμηση του mRNA-στόχου, οι πρωτεΐνες AGOs

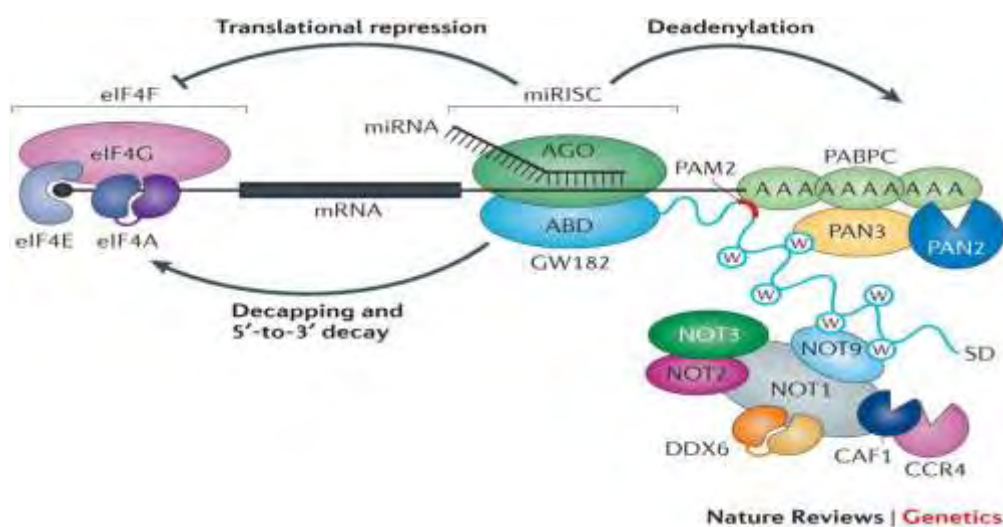
στρατολογούν άλλες πρωτεΐνες ώστε να πραγματοποιηθεί η αποσιώπηση. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται πρωτεΐνες-συνεργάτες και οι κυριότεροι εκπρόσωποι τους είναι οι πρωτεΐνες GW182. Οι GW182 λειτουργούν σαν ελαστική γέφυρα προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των AGO και άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους επιτελούν διάφορες διεργασίες, όπως για παράδειγμα τα σύμπλοκα αποαδενυλίωσης PAN2-PAN3 και CCRA-NOT. Η αποσιώπηση επιτυγχάνεται με συνδυασμό αναστολής της μετάφρασης, αποαδενυλίωσης, αφαίρεσης της καλύπτρας στο 5' άκρο του mRNA-στόχου και τελικά με την αποικοδόμηση του mRNA με κατεύθυνση 5' προς 3' (Jonas και συν., 2015). (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Η αναγνώριση του mRNA-στόχου και τα μονοπάτια αποσιώπησης μέσω micro-RNAs (Stamatina Giannouli και συν.. MicroRNAs: From Regulators of Gene Expression to Cancer Biomarkers, Chapter 8. In: Cancer Biomarkers, CRC Press, 1st edition (2012))

Πολλά μοντέλα έχουν προταθεί σε σχέση με το στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται η αναστολή της μετάφρασης από τα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs και τα οποία συχνά είναι αντικρουόμενα μεταξύ τους (Jonas και συν., 2015). Τελευταία, οι απόψεις φαίνεται να συγκλίνουν στην πρόταση ότι η αναστολή πραγματοποιείται κατά την έναρξη της

μετάφρασης αλλά ο ακριβής τρόπος δεν ακόμη είναι γνωστός. Το στάδιο αυτό αποτελεί ένα καθοριστικό βήμα της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών και θεωρείται σημείο ελέγχου πολλών ρυθμιστικών μηχανισμών (Jonas και συν., 2015). Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν διεργασίες σχετιζόμενες με την 5'καλύπτρα, όπως η πρόσδεση της 40s ριβοσωμικής υπομονάδας και των ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης της μεταγραφής (eIFs) στην παραπάνω περιοχή καθώς και διαδικασίες ανεξάρτητες από αυτήν (Petersen και συν., 2006). Στηριζόμενοι σε μελέτες κινητικής, προκύπτει ότι, πιθανόν, η μη συμπληρωματική πρόσδεση του miRNA και του miRISC στο mRNA-στόχο αρχικά αποτρέπει την πρόσδεση των απαραίτητων παραγόντων για την έναρξη της μεταγραφής του και ακολουθεί η αποαδενυλίωση και τελικά η αποικοδόμηση του (Jonas και συν., 2015). Για την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας συνεργάζονται πληθώρα πρωτεϊνών, όπως η GW182, η PABPC, το σύμπλοκο CCR4-NOT, οι οποίες αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας δραστικά σύμπλοκα. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4. Η διαμεσολάβηση των μικρών μη κωδικών μορίων RNA και των συνεργαζόμενων πρωτεϊνών στην αποσιώπηση του mRNA στόχου. (Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of micro RNA- mediated gene silencing. Nature Reviews. Genetics; (2015): 421-433.

#### 1.1.4 Η χρησιμότητα των μικρών μη κωδικών μορίων στη διάγνωση ασθενειών

Η παρατήρηση ότι τα miRNAs παρουσιάζουν σταθερότητα σε παραφινोποιημένους ιστούς από δείγματα ασθενών καθώς και στο ανθρώπινο πλάσμα, ανέδειξε την πιθανότητα η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των μορίων αυτών να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον καθορισμό των διαφόρων ασθενειών (Hybring και συν., 2013). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα ασθενών, σε κοινές καρκινικές κυτταρικές σειρές καθώς και σε όγκους τρωκτικών, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, γενικά, τα miRNAs στα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (πιθανά διαδραματίζουν ογκοκατασταλτικό ρόλο στα κύτταρα) καθώς και ότι προφίλ των miRNAs μπορεί να καθορίσει την προέλευση του όγκου καθώς και το αναπτυξιακό του στάδιο (Hybring και συν., 2013). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων σε σχέση με όγκους υψηλότερης διαφοροποίησης (Volinia και συν., 2006). Με βάση τις αρχικές αυτές μελέτες, οι έρευνες γενικεύτηκαν και προέκυψε ότι διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs παρατηρείται σε πληθώρα ασθενειών όπως διάφοροι τύποι καρκίνου (καρκίνος του μαστού, καρκίνος του προστάτη, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, καρκίνος του πνεύμονα κ.α.), κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς π.χ. HCV., καρδιαγγειακές παθήσεις, μυοπάθειες, νευροεκφυλιστικές παθήσεις, αυτοάνοσα νοσήματα, οστεοαρθρίτιδα καθώς και σε προβλήματα που σχετίζονται με την γυναικεία και ανδρική γονιμότητα και την ανάπτυξη του εμβρύου (Hybring και συν., 2013). Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών συγκεντρώνονται σε βάσεις δεδομένων, όπως η *human mi RNA associated disease database* (HMDD).

#### 1.1.5 Κυκλοφορούντα μικρά μη κωδικά μόρια RNA

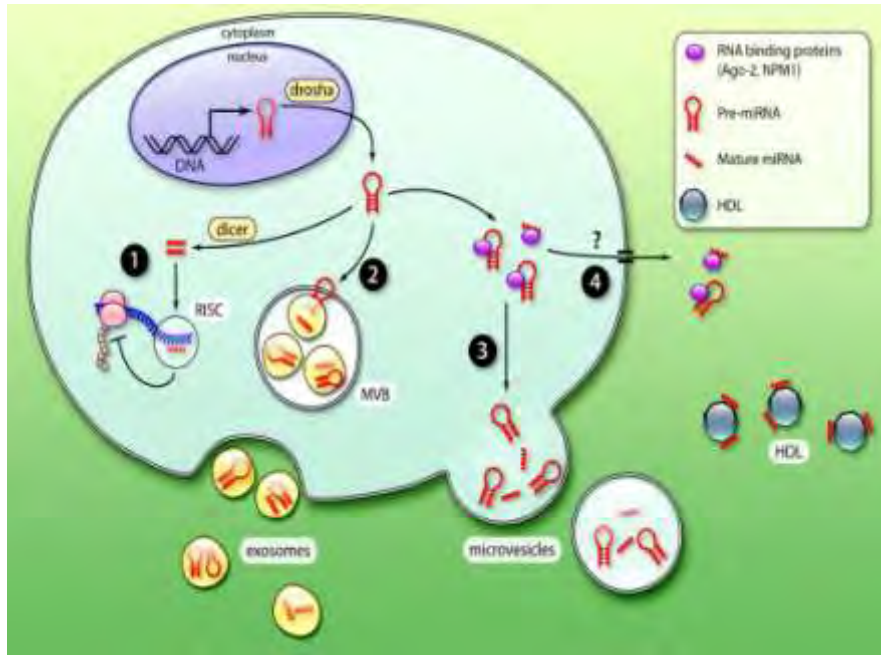
Τα πρότυπα έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων έχουν μελετηθεί κυρίως σε στερεούς ιστούς. Παρόλα αυτά, τα miRNAs, εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους και της υψηλής σταθερότητας που εμφανίζουν, είναι δυνατόν να απομονωθούν από το πλάσμα, τον ορό και το ολικό αίμα του ανθρώπου (Mitchell και συν., 2008). Επιπλέον, κυκλοφορούντα miRNAs έχουν βρεθεί στα ούρα, στο σάλιο και σε διάφορα άλλα ανθρώπινα υγρά. Η ιδιότητα αυτή των κυκλοφορόντων miRNAs έγινε άμεσα αντικείμενο μελέτης προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση πλήθους

ασθενειών όπως για παράδειγμα οι ασθενείς με B-cell Λέμφωμα στους οποίους παρουσιάζονται διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του miR-21 στο αίμα τους (Hybring και συν., 2013). Αξίζει εδώ να σημειωθεί, ότι ο ιδανικός βιοδείκτης πληροί έναν ορισμένο αριθμό κριτηρίων, όπως η εύκολη πρόσβαση σε αυτόν χωρίς τη χρήση επεμβατικών μεθόδων, ο υψηλός βαθμός ευαισθησίας και ειδικότητας, η δυνατότητα να διαφοροποιείται σε παθολογικές καταστάσεις, ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής μέσα στο δείγμα και η ικανότητα γρήγορης και ακριβούς διάγνωσης. Δεδομένου ότι τα miRNA εκπληρώνουν αρκετές από τις παραπάνω προϋποθέσεις, πολλές ερευνητικές ομάδες προσπαθούν να ανακαλύψουν πιθανές εφαρμογές τους σε αυτό το επίπεδο (Esther και συν., 2012). Έτσι για παράδειγμα, ο Boeri και οι συνεργάτες του κατέδειξαν ότι τα κυκλοφορόντα miRNAs ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν και για προγνωστικούς λόγους, όπως στην περίπτωση των καπνιζόντων ασθενών με καρκίνο του προστάτη (Hybring και συν., 2013)

Τα κυκλοφορούντα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs φαίνεται να αποδίδονται στην κυκλοφορία του αίματος με τρεις κυρίως τρόπους: είτε μέσω μικροσωματιδίων (εξωσώματα, microvesicles και αποπτωτικά σωμάτια) , τα οποία προσφέρουν προστασία από τις RNAασες,, είτε συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες, είτε δημιουργώντας σύμπλοκα με την λιποπρωτεΐνη HDL (Esther και συν., 2012).(Εικόνα 5)

Πολλές μελέτες προσανατολίζονται προς την κατεύθυνση χρήσης των κυκλοφορούντων miRNAs στη διάγνωση και πρόγνωση ασθενειών και κάποια από αυτά έχουν ήδη επικυρωθεί, αποδεικνύοντας την κλινική τους χρησιμότητα στο πεδίο της εξατομικευμένης ιατρικής (Wang και συν., 2016).





Εικόνα 5. Κυτταρικοί μηχανισμοί απελευθέρωσης και εξωκυτταρικά συστήματα μεταφοράς των miRNAs. (E.E. Creemers και συν. .Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease?. *Circ Res.* 2012;110:483-495)

## 1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΗ ΚΩΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA

Για τη μελέτη του προφίλ έκφρασης των miRNA στους διάφορους ιστούς καθώς και την πραγματοποίηση μελετών συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης τους με διάφορες ασθένειες χρησιμοποιούνται ποικίλες μέθοδοι. Οι κυριότερες από αυτές αφορούν στη χρήση μικροσυστοιχιών ειδικών για miRNA, στην ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR), στον *in situ* υβριδισμό καθώς και στην αλληλούχιση νέας γενιάς. Τόσο η qRT-PCR όσο και οι μέθοδοι υβριδισμού αποτελούν μεθόδους υψηλής ευαισθησίας και αξιοπιστίας για τη ποιοτική και ποσοτική μελέτη των micro RNAs.

Στις μεθόδους υβριδισμού για την ανάλυση του προφίλ έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων RNA θα πρέπει να συμπεριληφθούν ο *in situ* φθορίζων υβριδισμός (FISH) καθώς και ο *in situ* chromogenic υβριδισμός (CISH). Πρόκειται, όμως, για μεθόδους που απαιτούν περισσότερο χρόνο διεκπεραίωσης, ενώ ενδέχεται να παρατηρηθούν προβλήματα εξαιτίας του μη εκλεκτικού υβριδισμού των ανιχνευτών με ανώριμες μορφές των miRNAs (pre-miRNA, pre-miRNA) (Hybring και συν., 2013).

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing- NGS) αποτελεί μια εξαιρετικά ικανή μεθοδολογία για την ποσοτικοποίηση και ανίχνευση των miRNAs. Αν και δεν μπορεί να έχει την ακρίβεια της qPCR σε ό, τι αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό, μπορεί να ανιχνεύσει όλα τα miRNAs που βρίσκονται σε ένα δείγμα και να διακρίνει παρόμοιες αλληλουχίες miRNA καθώς και τις ισομορφές τους. Επιπλέον, δημιουργώντας τις κατάλληλες βιβλιοθήκες miRNA, δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα, χωρίς να διακυβεύεται η αρτιότητα ανάλυσης του κάθε δείγματος (Eminaga και συν., 2013).

### **1.3 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ**

Η ιδέα να χρησιμοποιηθούν τα miRNAs για θεραπευτικούς σκοπούς προέκυψε έπειτα από την παρατήρηση ότι παρεμβαίνοντας στα μόρια αυτά είχε σαν αποτέλεσμα αλλαγές στην κυτταρική έκβαση) (Hybring και συν., 2013). Αντίθετα από τους πρωτεϊνικούς αναστολείς, οι οποίοι στοχεύουν σε ένα μόνο μόριο, τα miRNAs έχουν τη δυνατότητα να διαμορφώσουν ολόκληρα γονιδιακά προγράμματα. Επιπλέον, η παρέμβαση σε αυτά έχει σαν αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό του κυττάρου αντί για καταστροφή του, γεγονός που μειώνει τη βλαβερή επίδραση σε υγιείς ιστούς. Λαμβάνοντας, δε, υπόψη ότι η απορρύθμισή των miRNAs έχει συσχετιστεί με μεγάλο εύρος ασθενειών καθώς και την ακρίβεια των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του προφίλ έκφρασης τους, μπορεί να θεωρηθεί ότι η παρέμβαση στα μόρια αυτά μπορεί να οδηγήσει σε ένα καλό θεραπευτικό αποτέλεσμα) (Hybring και συν., 2013).

Δύο είναι οι κύριες στρατηγικές παρέμβασης που ακολουθούνται προκειμένου να διαφοροποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs και εξαρτώνται από το αν τα επίπεδα αυτά είναι αυξημένα ή μειωμένα στην προς μελέτη ασθένεια σε σχέση με το φυσιολογικό (Ajay και συν., 2016). Στην πρώτη περίπτωση, στην οποία παρουσιάζεται αυξημένη έκφραση κάποιων miRNA, απαιτείται μείωση των επιπέδων και επιτυγχάνεται μέσω των miRNA ανταγωνιστών (miRNA inhibitors). Οι miRNA ανταγωνιστές είναι ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες με τα ενδογενή miRNAs και οι κύριοι εκπρόσωποί τους είναι οι εξής: τα antisense ολιγονουκλεοτίδια (AMO) ή antagomir, τα οποία αποτελούν τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα ολιγομερή, τα locked nucleic acid (LNA), τα οποία διακρίνονται από στενότερη συγγένεια με το miRNA-στόχο, είναι πιο ανθεκτικά στις νουκλεάσες και έχουν μικρότερη τοξικότητα και τέλος, τα peptide

nucleic acid (PNA), τα οποία είναι τεχνητά κατασκευασμένα συνθετικά πεπτιδικά πολυμερή, τα οποία δομικά μοιάζουν με το DNA και το RNA (Ajay και συν., 2016). Τέτοιες προσπάθειες έχουν ήδη γίνει αλλά παρουσιάζονται προβλήματα προκειμένου να βρεθεί ένας τρόπος να αποσιωπώνται συγκεκριμένα μετάγραφα που σχετίζονται την προς μελέτη ασθένεια, δεδομένου ότι μια ξαφνική παρέμβαση σε εκατοντάδες μετάγραφα θα ήταν βλαβερή για τον ασθενή (Burnett και συν., 2012). Η αργή πρόοδος πηγάζει, επιπλέον, από τεχνολογικές προκλήσεις που αφορούν συνολικά σε θεραπείες που βασίζονται στα μεσολαβούντα RNA (interference RNA) και περιλαμβάνουν προβλήματα που σχετίζονται με την μεταφορά στον ιστό- στόχο, την σταθερότητα και την αποφυγή ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος (Hybring και συν., 2013).

Στην δεύτερη περίπτωση, στην οποία μια ασθένεια σχετίζεται με μειωμένη λειτουργικότητα των miRNAs, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο, τα επίπεδα έκφρασης του miRNA στόχου μπορεί να αυξηθούν χρησιμοποιώντας ειδικούς φορείς. Οι φορείς αυτοί είτε υπερεκφράζουν το miRNA στόχο είτε μεταφέρουν τεχνητά δίκλωνα miRNA, γνωστά και ως mimics, τα οποία μιμούνται τη λειτουργία του (Ajay και συν., 2016). Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του miR-26a, τα επίπεδα έκφρασης, του οποίου είναι χαμηλά στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) στο ήπαρ ποντικού, έχουν σαν αποτέλεσμα την αναστολή πολλαπλασιασμού του όγκου και την έναρξη της απόπτωσης (Ajay και συν., 2016).

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, τα miRNAs παραμένουν πολύ σταθερά ακόμη και όταν απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, αφού ανθίσταται στην νουκλεολυτική δράση όντας κλεισμένα είτε σε εξωσώματα είτε σε μικροοσμήματα (microvesicles). Η δημιουργία τέτοιων τεχνητών οχημάτων είναι εφικτή, αλλά, προς το παρόν, ιδιαίτερα χρονοβόρα και δαπανηρή. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν θέματα σταθερότητας γίνεται προσπάθεια τα μόρια αυτά να τροποποιηθούν χημικά (Shukla και συν., 2010). (Πίνακας 1)

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Αντι-miRNA ολιγονουκλεοτίδια (AMOs)	Συμπληρωματική αλληλουχία με τα ώριμα miRNAs	Εκτεταμένη χρήση σε in vitro και in vivo πειράματα για μπλοκάρισμα των miRNAs
Τροποποιημένα 2'-OMe Αντι-miRNA ολιγονουκλεοτίδια	2'-O- methyl τροποποίηση	Πιο σταθερά χημικά μόρια και πιο ανθεκτικά στην επίδραση των νουκλεασών από τα AMOs
2'-MOE	2'-O-methoxyethyl τροποποίηση	Αυξάνει τη στεθερότητα, την αποτελεσματικότητα και την ειδικότητα
Locked nucleic acid (LNAs)	2'-4'-methylene τροποποίηση	Πιο ανθεκτικό στις ενδογενείς νουκλεάσες, υψηλότερη συγγένεια με το νουκλεοτίδιο-στόχο, χαμηλότερη τοξικότητα
Αδενοσχετιζόμενοι ιοί (AAV)	Αδενοσχετιζόμενοι φορείς	Εκτεταμένη χρήση για μεταφορά σε Συστήματα οργάνων
Sponges	Μετάγραφα που εκφράζονται από πλασμίδια και περιέχουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης με το miRNA-στόχος	Μπλοκάρουν ολόκληρες οικογένειες συγγενών miRNAs και κύτταρα που περιέχουν τα miRNAs-στόχους
Πλασμίδια	Πλασμίδια που περιέχουν miRNA-γονίδια, ενσωματωμένα σε λιποσώματα	Μεταφορά miRNA-λίγα πειραματικά δεδομένα
Polythyleminine (PEI)-mediated	Νανομόρια	Μεταφορά miRNA σε συστήματα ή τοπική αντικατάσταση miRNA
CC9	Νανομόρια με πεπτίδια που στοχεύουν σε όγκους	Μεταφορά miRNA
Anti-miR νουκλεοπετίδιο	Τεχνητό πολυμερές με με βασική δομή πεπτιδίου και πολλές ομοιότητες με το DNA και το RNA	Πιο στενή σύνδεση, σχετικά σταθερό, χορηγείται συστηματικά με χαμηλή τοξικότητα

Πίνακας 1. Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μεταφορά των microRNAs. (Ajay Francis Christopher και συν.. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. Perspect Clin Res. 2016 Apr-Jun; 7(2): 68–74).

Όπως είναι εύκολο να διαπιστωθεί, τα miRNAs αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Η ανακάλυψη τους άνοιξε ένα καινούριο παράθυρο στην κατανόηση φυσιολογικών βιολογικών μονοπατιών, τα οποία αφορούν κυρίως σε διαδικασίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση, καθώς και στο ενδεχόμενο χρήσης αυτών ως θεραπευτικά μόρια στις περιπτώσεις δυσλειτουργίας των παραπάνω μηχανισμών (Bartel και συν., 2004).

Ένα σημαντικό επιστημονικό πεδίο, στο οποίο φαίνεται πως η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των μικρών μη κωδικών μορίων, βρίσκει εφαρμογή είναι η αναπαραγωγική ιατρική. Τα κύτταρα και οι ιστοί που σχετίζονται με την αναπαραγωγή έχουν τη μοναδική ικανότητα να υπόκεινται σε μια συνεχή αναδιοργάνωση του μεταγραφώματος και του πρωτεώματος καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και του ενήλικου αναπαραγωγικού κύκλου. Τα

τελευταία χρόνια, οι γνώσεις μας γύρω από τους μηχανισμούς ρύθμισης των ριβονουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών έχουν αυξηθεί δραματικά. Έτσι, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να αποκαλυφθούν miRNAs που σχετίζονται με τη φυσιολογική διαδικασία ρύθμισης της δημιουργίας γαμετών, τόσο στα άρρενα όσο και στα θήλεα άτομα, καθώς και με τον τρόπο που διαφοροποιείται η έκφρασή τους σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την ανδρική και γυναικεία υπογονιμότητα καθώς και την αδυναμία εμφύτευσης του ζυγωτού.

## 2. ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί μια σύνθετη παθολογική κατάσταση, η οποία οφείλεται σε πληθώρα παραγόντων και χαρακτηρίζει το 4% των ανδρών παγκοσμίως (Munoz και συν., 2015). Οι αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας περιλαμβάνουν ανατομικές ανωμαλίες όπως η κισσοκήλη, μικροβιακές μολύνσεις, περιβαλλοντικούς παράγοντες, δυσλειτουργία της γαμετογένεσης, ορμονικές και ανοσολογικές διαταραχές καθώς και γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται τα ποσοστά εμφάνισης των συχνότερων αιτιών ανδρικής υπογονιμότητας (Tahmasbour και συν., 2014).

Male infertility disorders	Percentage References
Varicocele	37–40 %
Endocrine disorders	>20 %
Genital tract infections	8–35 %
Testicular failure	9 %
Genetic disorders	15–30 %
Antisperm antibody	8–19 %
Idiopathic	15–25 %

Πίνακας 2. Οι κυριότερες αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας. (Tahmasbpour e. et al.. A multi-faceted approach to understanding male infertility:gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). J Assist Reprod Genet (2014) 31:1115–1137)

Όπως φαίνεται, στον πίνακα αυτό οι γενετικές ανωμαλίες αποτελούν το 15-30% των αιτιών ανδρικής υπογονιμότητας, παρόλα αυτά, ενδεχομένως, γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες υποκρύπτονται και στην πλειοψηφία των υπόλοιπων αιτιών.

Στις επόμενες παραγράφους θα αναφερθούν οι κυριότερες γενετικές και επιγενετικές αιτίες που έχουν συσχετιστεί με την ανδρική υπογονιμότητα και την ανώμαλη σπερματογένεση, ενώ θα γίνει προσπάθεια να αναλυθεί σε βάθος ο ρόλος των μικρών μη κωδικών μορίων miRNAs στη μεταμεταφραστική ρύθμιση γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τα παραπάνω. Προκειμένου να γίνει καλύτερα κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο κάποιοι από αυτούς προκαλούν δυσλειτουργία στην γαμετογένεση, θα πραγματοποιηθεί, επίσης, μια σύντομη περιγραφή των σταδίων δημιουργίας των σπερματοζωαρίων.

## **2.1 Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ**

Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στα σπερματικά σωληνάρια του όρχι και περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την πρώτη φάση του μιτωτικού πολλαπλασιασμού, τη σπερματοκυτταρογένεση, τη δεύτερη φάση της μειωτικής διαίρεσης και την τρίτη φάση της κυτταρο-διαφοροποίησης, τη σπερμιογένεση. Πρόκειται για μια συνεχή διαδικασία που ξεκινάει κατά την εφηβεία και συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του αρσενικού. Στον άνθρωπο η όλη διαδικασία της σπερματογένεσης διαρκεί περίπου 70 ημέρες (Johnson M.H. & Everitt B.J, 2000)

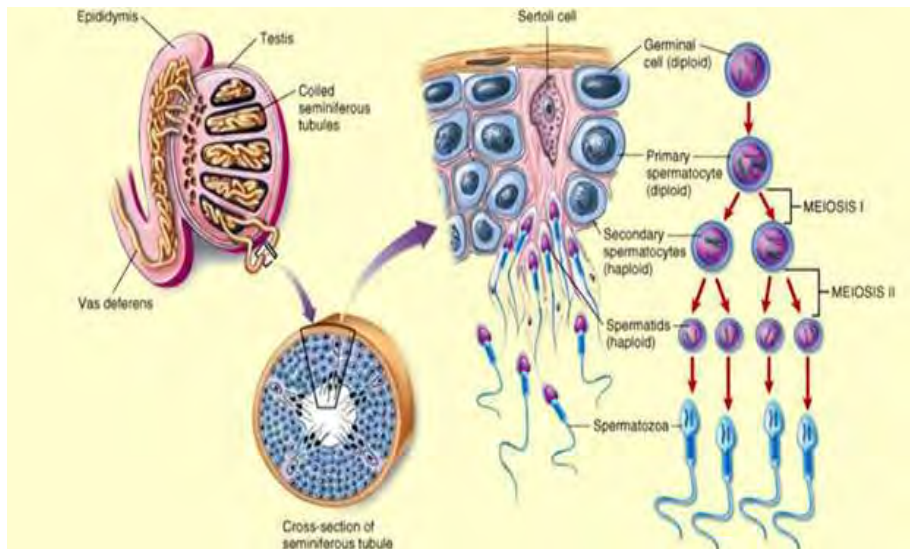
Κατά την πρώτη φάση, τα αδρανή αρχέγονα βλαστικά κύτταρα (προ-σπερματογόνια γεννητικά κύτταρα- SSCs ) του ανώριμου όρχι, ενεργοποιούνται κατά την εφηβεία και ξεκινούν κύκλους μιτωτικών διαιρέσεων δίνοντας τα σπερματογόνια κύτταρα. Κατά τη μιτωτική αυτή φάση της σπερματογένεσης χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι ενώ οι πυρηνικές διαιρέσεις είναι πλήρεις, οι κυτταροπλασματικές δεν ολοκληρώνονται με αποτέλεσμα όλα τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα που προκύπτουν να παραμένουν συνδεδεμένα με κυτταροπλασματικές γέφυρες σχηματίζοντας ένα μεγάλο συγκύτιο. Το συγκύτιο αυτό παραμένει και καθ' όλη τη διάρκεια των μειωτικών διαιρέσεων που ακολουθούν και ανεξάρτητα κύτταρα απελευθερώνονται μόνο κατά τα τελικά στάδια της σπερματογένεσης (Johnson M.H. & Everitt B.J, 2000).

Στη δεύτερη φάση, πραγματοποιείται η μειωτική διαίρεση. Η μειωτική διεργασία είναι συνεχής κατά την αναπαραγωγική περίοδο. Τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα πριν αρχίσουν την πρόφαση της πρώτης μείωσης MI διπλασιάζουν το DNA τους. Κατά τη διάρκεια της πρώτης μειωτικής διαίρεσης τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα μπορούν να διακριθούν σε ξεχωριστές κατηγορίες ανάλογα το στάδιο της μακρίας σε διάρκεια πρόφασης. Έτσι, διακρίνουμε κατά σειρά το στάδιο της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας και της διπλοταινίας. Από τη MI παράγονται τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα (σπερματοκύτταρα II). Τα σπερματοκύτταρα II παραμένουν στη μεσόφαση για ελάχιστο χρόνο και περνούν γρήγορα στη δεύτερη μείωση MII, από όπου προκύπτουν οι σπερματίδες (Johnson M.H. & Everitt B.J, 2000). (Εικόνα 8)

Στην τρίτη φάση, οι σπερματίδες διαφοροποιούνται σε σπερματοζώρια μέσω της διεργασίας της σπερμιογένεσης. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιούνται πολλές μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές. Τελικά, τα ώριμα σπερματοζώρια απελευθερώνονται στον αυλό του σπερματικού σωληναρίου (Johnson M.H. & Everitt B.J, 2000).

Σε όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης, τα σπερματικά κύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή με Sertoli κύτταρα, τα οποία θεωρείται ότι τους παρέχουν δομική και μεταβολική υποστήριξη (Johnson M.H. & Everitt B.J, 2000). (Εικόνα 8)

Η επιτυχής ολοκλήρωση της σπερματογένεσης και η δημιουργία φυσιολογικών ώριμων σπερματοζωαρίων αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη σωστή λειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος και την επιτυχή γονιμοποίηση του ωαρίου. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως, η παραπάνω διαδικασία χαρακτηρίζεται από κάποιο βαθμό αποτυχίας (spermatogenic failure) με αποτέλεσμα την αδυναμία δημιουργίας υγιών σπερματοζωαρίων και την υπογονιμότητα του ατόμου.



Εικόνα 8. Τα στάδια της σπερματογένεσης ([www.byjus.com](http://www.byjus.com))

## 2.2 ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΙΤΙΕΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

### 2.2.1 Χρωμοσωματικές ανωμαλίες

Τόσο οι αριθμητικές, όσο και οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες έχουν επιπτώσεις στην ανδρική γονιμότητα. Η παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος X, γνωστό ως σύνδρομο Klinefelter (47, XXY) ευθύνεται για τη στειρότητα αυτών των ατόμων. Σε 12% των ανδρών με στειρότητα ή υπογονιμότητα παρατηρείται, είτε αριθμητική ανωμαλία των χρωμοσωμάτων του φύλου, είτε κάποια δομική αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων (Gardner & Sutherland, 2004).

Από τις δομικές αναδιατάξεις των χρωμοσωμάτων οι αμοιβαίες μεταθέσεις είναι εκείνες οι οποίες σχετίζονται συχνότερα, τόσο με τη γυναικεία, όσο και με την ανδρική υπογονιμότητα και τις καθ' ἑξίν αποβολές. Οι φορείς μεταθέσεων έχουν αυξημένο κίνδυνο σύλληψης εμβρύου με σοβαρή χρωμοσωματική ανωμαλία. Ο κίνδυνος κυμαίνεται από 0.5-50%, ανάλογα με τη μετάθεση. Οι επιπτώσεις στη γονιμότητα είναι σοβαρότερες στους άνδρες φορείς. Παρ' όλα αυτά, πρέπει να τονισθεί ότι δεν προκαλούν όλες οι μεταθέσεις προβλήματα στη σπερματογένεση. Θεωρητικά, 25% έχουν ως αποτέλεσμα τη σύλληψη φυσιολογικού εμβρύου, 25% εμβρύου φορέα της γονικής μετάθεσης και 50% παθολογικού εμβρύου με ανισοζυγισμένο χρωμοσωματικό υλικό. Τα ποσοστά όμως αυτά ποικίλλουν πολύ, ανάλογα με τη μετάθεση (Gardner & Sutherland, 2004).



Σε υπογόνιμους ή στείρους άνδρες με φυσιολογικό καρυότυπο και ανωμαλίες στον αριθμό ή τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι αυξημένη η συχνότητα χρωμοσωματικών ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια, κυρίως των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Στην ολιγοσπερμία και στην ολιγοασθενοσπερμία, έχει παρατηρηθεί ότι 70% των σπερματοζωαρίων έχουν ανευπλοειδίες κυρίως των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y. Αντιθέτως, η μειωμένη κινητικότητα δεν έχει συσχετισθεί με χρωμοσωματικές ανωμαλίες.

### 2.2.2 Γονιδιακές βλάβες

Η ανθρώπινη αναπαραγωγή είναι μια πολύ πολύπλοκη διαδικασία στην οποία λαμβάνουν μέρος χιλιάδες γονίδια τα οποία ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται σε διάφορα στάδια, ήδη από την εμβρυϊκή ζωή. Μερικά από αυτά μας είναι γνωστά, πολλά όμως μένουν ακόμη να διευκρινιστούν.

Φαίνεται να ενέχονται 50 γονίδια τα οποία σχετίζονται με την σπερματογένεση. Τα κυριότερες μεταλλάξεις γονιδίων, οι οποίες εμπλέκονται στην ανδρικής υπογονιμότητα είναι οι εξής:

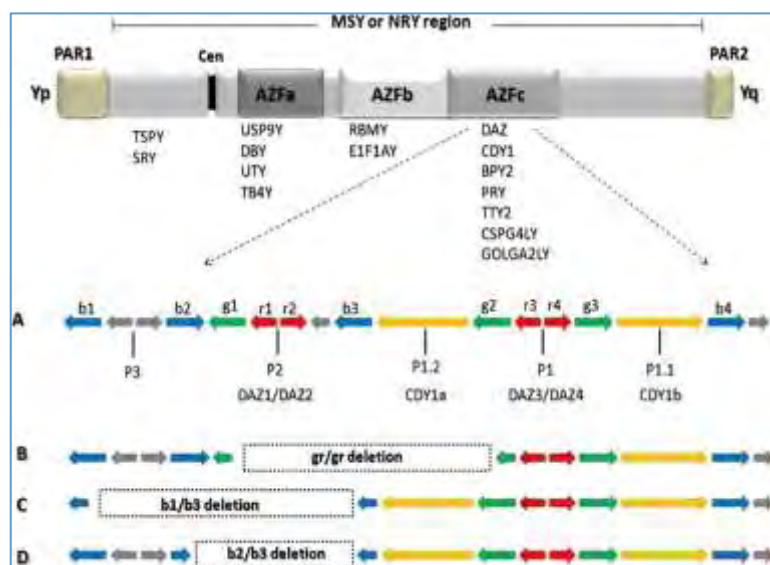
#### Μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y

Το 1996 ο Vogt και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν τρεις περιοχές πάνω στο χρωμόσωμα Y, οι οποίες παρουσίαζαν συστηματικά ελλείψεις σε άνδρες με υπογονιμότητα (Vogt και συν., 1996). Ονόμασαν την ευρύτερη περιοχή παράγοντα αζωοσπερμίας ή αλλιώς *AZF* (*azoospermia factor*) και την διαχώρισαν σε 3 περιοχές, τις οποίες ονόμασαν *AZF<sub>a</sub>*, *AZF<sub>b</sub>* και *AZF<sub>c</sub>*, αντίστοιχα. (Εικόνα 9)

Η περιοχή *AZF<sub>a</sub>* φέρει τα γονίδια *USP9Y* και *DBY*, ενώ η περιοχή *AZF<sub>b</sub>* τα γονίδια *RBMY* (Tahmasbour και συν., 2014). Τα γονίδια αυτά εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις και η έλλειψη της περιοχής αυτής προκαλεί διακοπή της σπερματογένεσης και αζωοσπερμία. (Εικόνα 9)

Τα μικροελλείμματα στην περιοχή *AZF<sub>c</sub>* είναι αυτά τα οποία απαντώνται συχνότερα σε υπογόνιμους άντρες (Tahmasbour και συν., 2014). Παρατηρούνται ολοκληρωτικές και μερικές ελλείψεις της περιοχής και προκαλούν ποικιλία φαινοτύπων (από ολιγοσπερμία έως αζωοσπερμία). Σύμφωνα με μελέτες το 13% των υπογόνιμων ανδρών φέρουν μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή (Vogt και συν., 1996). Τα σημαντικότερα γονίδια που συναντώνται σε αυτήν είναι τα *DAZ*, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστικοί παράγοντες στη

μεταγραφή και στη μειωτική διαίρεση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων καθώς και στην εξασφάλιση της σταθερότητας του αριθμού τους.



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της περιοχής AZF και των επιμέρους γονιδίων (Tahmasbpour E. και συν.. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). J Assist Reprod Genet (2014) 31:1115–1137)

### Μεταλλάξεις στο γονίδιο της κυστικής ίνωσης (CFTR) και συγγενής αμφοτερόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου (CBAVD)

Πολύ σημαντικό ρόλο στην αποφρακτική ανδρική υπογονιμότητα διαδραματίζει το γονίδιο *CFTR*, το οποίο εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα εξωκρινών ιστών (πνεύμονες, πάγκρεας, ιδρωτοποιοί αδένες, σπερματικός πόρος) και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που λειτουργεί ως κανάλι μεταφοράς ιόντων χλωρίου (Tahmasbour και συν., 2014). Στο γονίδιο αυτό έχουν περιγραφεί πάνω από 1500 μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί, με συχνότερη τη μετάλλαξη *F508del*. Οι ασθενείς με κυστική ίνωση είναι υπογόνιμοι στο 95% των περιπτώσεων εξαιτίας της συγγενούς αμφοτερόπλευρης απόφραξης του σπερματικού πόρου (CBAVD), την οποία παρουσιάζουν (Tahmasbour και συν., 2014). Συγγενής αμφοτερόπλευρη απόφραξη του

σπερματικού πόρου (*CBAVD*), όμως, παρουσιάζεται και στο 2-6 % των κατά τα άλλα φυσιολογικών υπογόνιμων ανδρών (Tahmasbour και συν., 2014). Το 60% αυτών των περιπτώσεων φέρουν ήπιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR*. Στους ασθενείς με *CBAVD* η σπερματογένεση ολοκληρώνεται κανονικά και είναι εφικτή η ανάκτηση σπερματοζωαρίων με βιοψία όρχεων.

#### Σύνδρομο μη απόκρισης στα ανδρογόνα (*AIS: androgen insensitivity syndrome*)

Πρόκειται για ένα φυλοσύνδετο νόσημα που χαρακτηρίζεται από ελαττωματική αρρενοποίηση σε άτομο με καρυότυπο 46,XY με ποικιλία φαινοτύπων (Brinkmann και συν., 2011). Διακρίνεται σε σύνδρομο ολικής μη απόκρισης στα ανδρογόνα (*CAIS: Complete androgen insensitivity syndrome*) με εξωτερικά γεννητικά όργανα φυσιολογικού θήλεος ατόμου, σε σύνδρομο μερικής μη απόκρισης στα ανδρογόνα (*PAIS: Partial androgen insensitivity syndrome*) με εξωτερικά γεννητικά όργανα μερικώς αρρενοποιημένα και τέλος σε σύνδρομο ήπιας μη απόκρισης στα ανδρογόνα (*MAIS: Mild androgen insensitivity syndrome*) με εξωτερικά γεννητικά όργανα άρρενος ατόμου.

Το σύνδρομο αυτό οφείλεται σε ελαττωματική λειτουργία του γονιδίου του υποδοχέα ανδρογόνων (*AR: Androgen Receptor*). Το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε διάφορους ιστούς από την όγδοη κιόλας εβδομάδα κύησης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετατροπή του αγωγού του Wolf σε επιδιδυμίδα, σπερματικό πόρο και σπερματοδόχους κύστεις καθώς και στη σπερματογένεση. Η μεγάλη ποικιλία των φαινοτύπων οφείλεται στη δυνατότητα επέκτασης του γονιδίου. Το 2% των κατά τα άλλα φυσιολογικών υπογόνιμων ανδρών παρουσιάζει μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό (Brinkmann και συν., 2011).

#### Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός και σύνδρομο *Kallman*

Ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός είναι ένα νόσημα που παρατηρείται σε 1:10000 άρρενα άτομα. Η υπογονιμότητα σε αυτήν την περίπτωση οφείλεται σε ελαττώματα στο σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης και στην αδυναμία φυσιολογικής έκκρισης γοναδοτροπινών. Ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός συνοδευόμενος από ανοσμία αποτελεί το σύνδρομο *Kallman*. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του συνδρόμου *Kallman* είναι η απουσία όσφρησης, ο υπογοναδισμός, η αναστολή της σπερματογένεσης, η ατροφία όρχεων, η κρυσορχία και η αμφίχειρη συνκινησία. Υπάρχουν αρκετά γονίδια που

σχετίζονται με το σύνδρομο αυτό με κυριότερα τα γονίδια *KAL1*, *KAL2*, *GNRHR* (Tahmasbour και συν., 2014).

#### Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA του σπέρματος

Η έκθεση των σπερματοζωαρίων σε χημικά ενεργοποιημένα μόρια (*ROS*), προκαλούν μεταλλάξεις στο ευάλωτο λόγω σχήματος μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητικότητα και πιθανά την απόπτωση των σπερματοζωαρίων (Poongothai και συν., 2009).

### **2.2.3 Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στην ανδρική υπογονιμότητα**

Με τον όρο επιγενετική περιγράφεται ο κληρονομούμενος και αναστρέψιμος μετασχηματισμός της ενεργότητας και της έκφρασης ενός γονιδίου χωρίς να τροποποιηθεί η αλληλουχία του DNA. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορεί να κληρονομηθούν είτε μέσω της μιτωτικής είτε μέσω της μειωτικής διαίρεσης.

Πολλές μελέτες έχουν παρατηρήσει γενικευμένη μεθυλίωση του γονιδιώματος ή κάποιων συγκεκριμένων γονιδίων στα σπερματοζωάρια ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (Gunes και συν., 2016). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί απώλεια της μεθυλίωσης σε εντυπωμένες περιοχές (differentially methylated regions- DMRs) σε δείγματα σπέρματος με ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία (OAT), οι οποίες κανονικά εμφανίζονται μεθυλιωμένες, όπως η περιοχή H19 DMR. Επιπρόσθετα, ανώμαλα προφίλ μεθυλίωσης εμφανίζονται και σε ασθενείς με ολιγοσπερμία, όπως για παράδειγμα η αυξημένη μεθυλίωση του παράγοντα Insulin Growth Factor 2 (IGF2), η οποία οδηγεί σε ανώμαλους κύκλους μιτωτικών διαιρέσεων κατά την σπερματογένεση (Gunes και συν., 2016). Επίσης, σε ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοοσπερμία (NOA) παρουσιάζεται διαφοροποιημένη μεθυλίωση στο γονίδιο της methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), το οποίο είναι απαραίτητο ένζυμο για τις αντιδράσεις μεθυλίωσης (Gunes και συν., 2016).

Μια ακόμη επιγενετική τροποποίηση αφορά στην τροποποίηση των ιστονών. Είναι γνωστό ότι η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών H3 και H4, οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής, μέσω ανοίγματος της δομής της χρωματίνης. Σε πειράματα σε ποντίκια, η απαλοιφή του γονιδίου της ιστόνης H3.3, η οποία ενέχεται σε πληθώρα βιολογικών εργασιών όπως η ανάπτυξη και μεταγραφική μνήμη, προκάλεσε ανωμαλίες στη μορφολογία των όρχεων και στη σπερματογένεση (Gunes και συν., 2016). Επιπλέον

μελέτες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για τη συσχέτιση της τροποποίησης των ιστονών με την ανδρική υπογονιμότητα.

Το τελευταίο τμήμα της επιγενετικής ρύθμισης αφορά στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές προκαλούν διαφοροποιήσεις στην έκφραση γονιδίων και επιτυγχάνεται, μεταξύ άλλων, με τη μεσολάβηση των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs. Στο κομμάτι αυτό θα πραγματοποιηθεί εκτενής αναφορά τόσο σε σχέση με την εμπλοκή τους στη φυσιολογική σπερματογένεση όσο και σε παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν σε υπογονιμότητα.

### **2.2.3 Micro-RNAs και σπερματογένεση**

Η σπερματογένεση αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη αναπτυξιακή διαδικασία, όπου αυστηρά καθορισμένα γεγονότα διαδέχονται το ένα το άλλο, προκειμένου από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και τα σπερματογόνια να παραχθούν ώριμα σπερματοζωάρια. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός προγράμματος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, η οποία εξαρτάται κυρίως από μεταμεταγραφικές διαδικασίες. Σύμφωνα με μελέτες, οι βασικοί ρυθμιστές αυτών των γεγονότων είναι τα micro RNAs (Munoz και συν., 2015).

Πρόσφατα δεδομένα, υποδεικνύουν ότι τόσο τα ίδια τα mi-RNAs όσο και τα μόρια που συμμετέχουν στη διαδικασία βιογένεσης τους, όπως οι πρωτεΐνες Dicer και Drosha, αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Για παράδειγμα, η απώλεια λειτουργικότητας της πρωτεΐνης Dicer, στα κύτταρα Sertoli, αναστέλλει τη φυσιολογική τους λειτουργία και οδηγεί στον σταδιακό εκφυλισμό των όρχεων, την ανδρική υπογονιμότητα και την ολική απουσία σπερματοζωαρίων (Papaioannou και συν., 2010). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον ουσιαστικό ρόλο του Dicer-εξαρτώμενου μονοπατιού στην φυσιολογική ανάπτυξη των αρσενικών γεννητικών κυττάρων στα θηλαστικά. Παρόμοια επίδραση παρουσιάζει και η εκλεκτική αδρανοποίηση των πρωτεϊνών Drosha και Dicer στα σπερματοκύτταρα, η οποία τελικά οδηγεί σε ολιγοτεροζωοσπερμία ή αζωοσπερμία (Papaioannou και συν., 2010). Πειράματα απαλοιφής της Dicer1 σε προσπερματογόνια ποντικού, λίγο πριν την γέννηση, οδήγησαν σε μεταβολές της μειωτικής διαδικασίας, μειωμένο αριθμό κυκλικών σπερματίδων και μορφολογικές ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων (Chen και συν., 2017). Επιπλέον, απώλεια

της Dicer1 στο στάδιο των απλοειδών σπερματίδων σε διαγονιδιακά ποντίκια οδήγησε σε ανώμαλη μορφολογία των επιμηκυμένων σπερματίδων και των σπερματοζωαρίων, αλλά ελαφρύτερο φαινότυπο σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα (Chen και συν., 2017). Συμπερασματικά, όσο πιο πρώιμο είναι το στάδιο της σπερματογένεσης κατά το οποίο πραγματοποιείται η απαλοιφή της Dicer, τόσο σοβαρότερα είναι τα αποτελέσματα στον τελικό φαινότυπο των σπερματοζωαρίων.

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, τα προ-σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα (SSCs) αποτελούν τα πρωταρχικά κύτταρα της σπερμιογένεσης και διακρίνονται από μια συνεχή διαδικασία αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης προς σπερματοζωάρια. Η διατήρηση αυτής της ισορροπίας διασφαλίζει τη συνεχή παραγωγή σπερματοζωαρίων. Στους όρχεις, τα SSCs βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον ή αλλιώς κόγχη (niche). Στο περιβάλλον αυτό, η αυτοανανέωση του SSC φαίνεται ότι προάγεται από ένα παρακρινή νευροτροφικό παράγοντα που ονομάζεται *Glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF), ο οποίος σηματοδοτεί την κυτταρική διαίρεση μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT (Yang και συν., 2014). Τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση αυτού του μονοπατιού αυτοανανέωσης. Έχειδειχθεί ότι το miR-20 μαζί με τα miR-21, -34c, -135a, -146a, -182, -183, -204, -465a-3p, -465b-3p, -465c-3p, -465c-5p and -544, κατά προτίμηση εκφράζονται στον ανανεούμενο πληθυσμό των προ-σπερματογόνιων βλαστικών κυττάρων, ενώ τα miR-20, miR-21 and miR-106a συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης των SSCs ποντικού (Chen και συν., 2017). (Εικόνα 10). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το miR-204 σχετίζεται με την απόπτωση των προ-σπερματογόνιων στην κατσίκα, μέσω του αποπτωτικού μονοπατιού p53 (Chen και συν., 2017). Από την άλλη πλευρά, κάποια μικρά μη κωδικά μόρια RNAs, μεταξύ των οποίων τα miR-146, η οικογένεια miR-let7 και τα συμπλέγματα miR-17-92 και miR-106b-25, σχετίζονται με την διαφοροποίηση των προ-σπερματογόνιων. Τα προαναφερθέντα miRNAs παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης κατά την επαγωγή της διαφοροποίησης και την είσοδο στη μειωτική διαίρεση, μετά την επίδραση του ρετινοϊκού οξέος (RA) (Tong και συν., 2012). Πειράματα απαλοιφής του συμπλέγματος miR-17-92 σε γεννητικά κύτταρα άρρενος έχουν σαν αποτέλεσμα μειωμένο αριθμό προ-σπερματογόνιων και ανεπαρκή σπερματογένεση (Chen και συν., 2017). Τα mi-RNAs φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταμεταφραστική ρύθμιση κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης, ενώ, όπως προκύπτει από όλα τα προηγούμενα, φαίνεται ότι τα mi RNAs καθορίζουν το πεπρωμένο τον προ-σπερματογόνιων βλαστικών κυττάρων.

Το τελευταίο διάστημα συσσωρεύονται δεδομένα σχετικά με την ρύθμιση των μειωτικών διαιρέσεων από συγκεκριμένα miRNAs (Εικόνα 10). Τα συμπλέγματα miR-449 και miR-34 b/c παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης κατά την έναρξη της μείωσης των σπερματογονίων στους αναπτυσσόμενους και ώριμους όρχεις, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι τα δύο αυτά συμπλέγματα συνεργάζονται για την ομαλή ρύθμιση της σπερματογένεσης (Chen και συν., 2017). Επίσης, το miR-18, μέλος του miR-17-92 συμπλέγματος, παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα σπερματοκύτταρα και στοχεύει τον Heat Shock Factor 2 (Hsf2), ο οποίος αποτελεί κρίσιμο μεταγραφικό παράγοντα της σπερματογένεσης (Chen και συν., 2017).

Όπως είναι γνωστό, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης πραγματοποιείται μια μοναδική αναδιάρθρωση στην χρωματίνη, κατά την οποία οι ιστόνες αντικαθίστανται από πρωτεΐνες πακεταρίσματος του DNA, όπως οι μεταβατικές πρωτεΐνες (Transition proteins-TPs) και οι πρωταμίνες (PRMs) (Kleene και συν., 2003). Στα μεταμιτωτικά γεννητικά κύτταρα, η χρονικά καθορισμένη έκφραση των TPs και PRMs είναι απαραίτητη για την σωστή συσπείρωση της χρωματίνης κατά την σπερμιογένεση. Η εξασφάλιση αυτού του αυστηρά χρονικά καθορισμένου μονοπατιού υπόκεινται σε μεταμεταφραστικό έλεγχο. Έχει αποδειχθεί ότι το miR-469 καταστέλλει την μετάφραση των TP2 και PRM2, στοχεύοντας τα αντίστοιχα m-RNAs κατά το στάδιο της παχυταινίας και των σφαιρικών σπερματίδων (Dai και συν., 2011). Επιπρόσθετα, το miR-122a προκαλεί αποδόμηση των TP2-mRNAs στα τελευταία στάδια της σπερμιογένεσης (Yu και συν., 2005).

Τέλος, κατά τη διάρκεια του σταδίου των επιμηκυμένων σπερματίδων (elongating spermatids), επειδή η χρωματίνη του πυρήνα είναι υπερσυσπειρωμένη, τα γονίδια που απαιτούνται για την σπερμιογένεση μεταγράφονται κατά τη διάρκεια του σταδίου της παχυταινίας και των πρόωρων σφαιρικών σπερματίδων (round spermatides) και «αποθηκεύονται», δημιουργώντας σύμπλοκο με τα RISC. Παραμένουν σε αυτή την κατεσταλμένη μορφή μέχρι να καταστεί απαραίτητη η έκφρασή τους. Το παραπάνω στάδιο είναι πολύ κρίσιμο για τη σωστή μετα-μιτωτική ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων (Gou και συν., 2014).

Παρόλο που η πλειοψηφία των miRNAs εξαφανίζεται κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης, έχουν παρατηρηθεί miRNAs που παίζουν σημαντικό ρόλο στα

σπερματοζωάρια. Το miR-34 είναι παρόν στα σπερματοζωάρια και το ζυγωτό του ποντικού αλλά όχι στα ωοκύτταρα ή στα έμβρυα μετά το στάδιο του ενός κυττάρου. Κατά την γονιμοποίηση, το miR-34 μεταφέρεται από τα σπερματοζωάρια στο ζυγωτό και μειώνει την έκφραση των Bcl-2 και p27, προάγοντας την είσοδο στην φάση S και την πρώτη διαίρεση του ζυγωτού. Η προσθήκη miR-34 αναστολέα στο ζυγωτό, αναστέλλει την σύνθεση του DNA και καταστέλλει την πρώτη διαίρεση του ζυγωτού, υποδηλώνοντας ότι αυτό είναι απαραίτητο στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (Liu και συν., 2012). Τέλος, λανθασμένη ρύθμιση των miR-424/322 έχει σαν αποτέλεσμα σπασίματα διπλής έλικας στο DNA των σπερματοζωαρίων (Chen και συν., 2017).

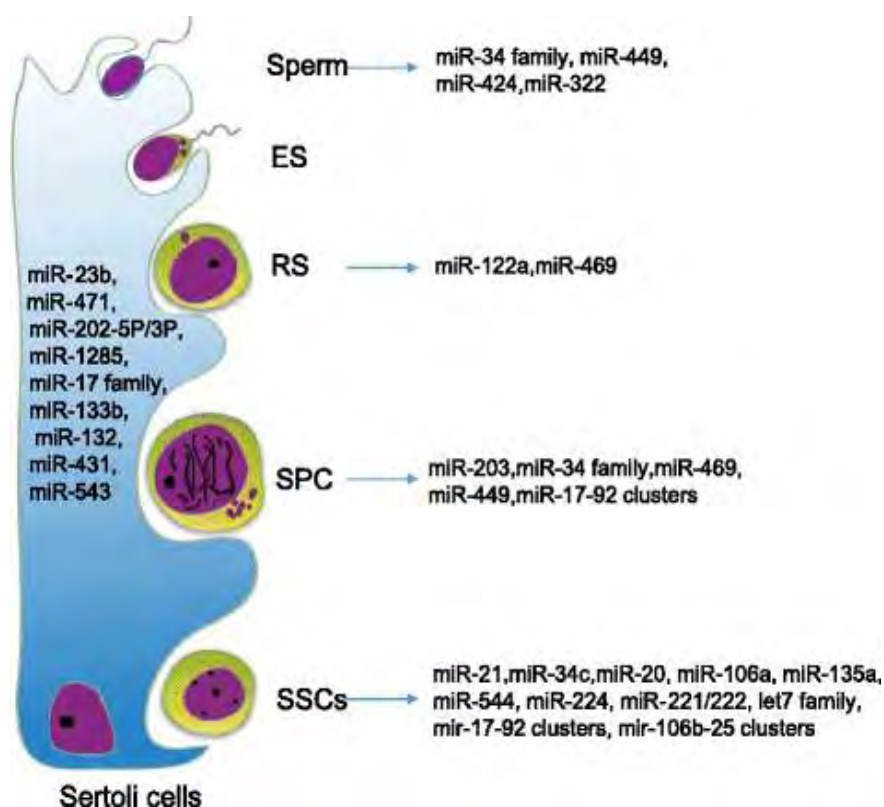
Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, η σπερματογένεση υποστηρίζεται από τα κύτταρα Sertoli και τα κύτταρα Leydig. Οι παράγοντες που εκκρίνονται από αυτά τα σωματικά κύτταρα προκαλούν συγκεκριμένα γεγονότα στα γεννητικά κύτταρα τα οποία επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τη σπερματογένεση. Έχει διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα Sertoli παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά έκφρασης μικρών μη κωδικών μορίων, μεταξύ των οποίων τα miR-23b, miR-471, miR-202-5P/3P, miR-17 family, miR-132, miR-133, miR-431, miR-543 (Ortogerro και συν., 2013). (Εικόνα 9). Τα miR-133b και miR-202 έχουν συσχετιστεί με την αζωοοσπερμία και το σύνδρομο Sertoli cells only (Chen και συν., 2017). Επιπρόσθετα, πειράματα απαλοιφής της Dicer1 στα κύτταρα Sertoli είχαν ως αποτέλεσμα διακοπή της σπερματογένεσης και σταδιακή ατροφία των όρχεων, γεγονός που υποστηρίζει τον κρίσιμο ρόλο των mi-RNAs στη σωστή λειτουργία των κυττάρων αυτών (Kim και συν., 2010). (Εικόνα 10)

Όπως είναι γνωστό, η δράση της ορμόνης FSH και των ανδρογόνων, είναι θεμελιώδης για την σωστή παραγωγή των σπερματοζωαρίων. Προκειμένου να διευκρινιστεί ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου η FSH και τα ανδρογόνα επιδρούν στα κύτταρα Sertoli, ο Nicolls και οι συνεργάτες του, διερεύνησαν την έκφραση και ρύθμιση των μικρών μη κωδικών μορίων στα κύτταρα αυτά (Nicholls και συν., 2011). Οι συγγραφείς βρήκαν ότι ένας αριθμός miRNAs παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης έπειτα από την αναστολή έκφρασης των ορμονών σε μοντέλα αρουραίων και καλλιέργειες κυττάρων Sertoli. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ενδοκυτταρική φωσφατάση Pten και η πρωτεΐνη Eps15, η οποία αποτελεί παράγοντα ενδοκύττωσης, εμφάνισαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα παραπάνω κύτταρα. Επιπρόσθετα με αυτό, η *in vitro* υπερέκφραση του miR-23b είχε



ως αποτέλεσμα τη μειωμένη μετάφραση των πρωτεϊνών PTEN και EPS15 (Nicholls και συν., 2011). Άλλες μελέτες κατέδειξαν ότι η οιστραδιόλη, τα υψηλά επίπεδα της οποίας σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα, ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Sertoli με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ο οποίος με τη σειρά του καθορίζεται από τα επίπεδα του miR-17 και miR-1285 (Kumar και συν., 2016). Όπως προκύπτει από όλα τα προηγούμενα, φαίνεται ότι τα miRNAs αποτελούν μια νέα παράμετρο στην ορμονοεξαρτώμενη διαδικασία της σπερματογένεσης.

Συνολικά, διαπιστώνεται ότι τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA εκφράζονται κατά την σπερματογένεση με έναν κυτταροειδικό και σταδιοεξαρτώμενο τρόπο. Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος και ο μηχανισμός δράσης των microRNAs παραμένει ακόμη άγνωστος σε μεγάλο βαθμό και αποτελεί πρόκληση για μελλοντικές μελέτες.



Εικόνα 10. Τα micro RNAs που εκφράζονται στα κύτταρα του όρχι. (Xiaoxu Chen και συν., The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. Journal of Animal Science and Biotechnology (2017) 8:35)

SSC= Spermatogonial stem cells

SPC= Spermatocyte

RS= round spermatids,

ES= elongated spermatids

#### 2.2.4 Μεταβολές στο προφίλ έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs σε άνδρες με υπογονιμότητα

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, έχει παρατηρηθεί ότι τα miRNAs παρουσιάζουν ένα αυστηρά καθορισμένο προφίλ έκφρασης καθ' όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης στους διάφορους τύπους κυττάρων. Η έκφρασή τους φαίνεται να διαφοροποιείται στα διάφορα είδη ανεπαρκούς σπερματογένεσης, τα οποία οδηγούν σε προβλήματα γονιμότητας (Πίνακας 3).

Μελέτες έκφρασης miRNAs έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορους ιστούς, κύτταρα και βιολογικά υγρά ανδρών με υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, ο Lian και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι οι όρχεις ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (Non-obstructive azoospermia-NOA) παρουσίαζαν τροποποιημένο προφίλ έκφρασης σε 173 miRNAs σε σχέση με γόνιμους άνδρες, μεταξύ αυτών και πολλά μέλη του συμπλόκου hsa-miR-17-92 cluster (hsa-miR-1, hsa-miR-181a, hsa-miR-221 and hsa-miR-9\*) και του συμπλόκου hsa-miR-371 (hsa-miR-371, hsa-miR-372, hsa-miR-373), τα οποία εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (Lian και συν., 2009). Συνολικά, 154 miRNAs παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης και 19 υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, ενώ κάποια από αυτά αποτελούν πιθανά νέα ογκογονίδια, τα οποία ενδεχομένως συμμετέχουν στην ανάπτυξη όγκων των γεννητικών οργάνων<sup>52</sup>. Σε μια άλλη μελέτη αποδείχτηκε ότι τα hsa-miR-34b\*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-449a και hsa-miR-449b, εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στους όρχεις υπογόνιμων ανδρών με διαφορετικά ιστοπαθολογικά αίτια (ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα) (Lian και συν., 2009). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι αυτά τα miRNAs πιθανά συμβάλλουν στη ρύθμιση της ανάπτυξης των αρρένων γεννητικών και σωματικών κυττάρων και οι διαφοροποιήσεις τους σχετίζονται με δυσλειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος (Lian και συν., 2009).

Η μελέτη της ιδιοπαθούς ανδρικής υπογονιμότητας είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, γιατί στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι γνωστή η γενετική της αιτία και συνυπάρχουν πολλοί παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν τον φαινότυπο. Η Boissière και οι συνεργάτες της προσπάθησαν να συνοψίσουν διάφορες μελέτες έκφρασης miRNAs υπογόνιμων ανδρών που πραγματοποιήθηκαν σε σπερματικό υγρό, σπερματοζώαρια και εξωκυτταρικά οχήματα (συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων) και παρουσίασαν

παρόμοια προφίλ έκφρασης χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δύο διαφορετικές τεχνικές (micro-array, NGS ή RT- qPCR). Συνολικά, επεξεργάστηκαν 6 διαφορετικές μελέτες και τα αποτελέσματα συνοπτικά απεικονίζονται στον πίνακα 3. Περιληπτικά, από τις έξι αυτές μελέτες σχετικά με την ιδιοπαθή υπογονιμότητα (οι οποίες περιλάμβαναν ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία, ολιγοασθενοσπερμία ή ολιγοασθενοζωοσπερμία) διαπιστώθηκε ότι πέντε miRNAs εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση ενώ τέσσερα χαμηλότερη έκφραση συγκριτικά με γόνιμους άντρες. Από αυτά τα hsa-miR-42 και το hsa-miR-1275 (υψηλότερη έκφραση) και το hsa-miR-15b (χαμηλότερη έκφραση) σχετίζονται με την σπερματογένεση, ενώ το hsa-miR-141(υψηλότερη έκφραση) αφορά στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τέλος, τα hsa-miR-19b, hsa-miR-483-5p (υψηλότερη έκφραση) και τα hsa-miR-28-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-1973 (χαμηλότερη έκφραση) δεν έχουν σχετιστεί με κάποια βιολογική διαδικασία (Boissiere και συν., 2017). (Πίνακας 3)

Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, ασθενείς με αζωοσπερμία, παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα hsa-miR-27a, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-5p και hsa-miR-548d-5p, ενώ τα hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-520 και hsa-miR-520d-3p εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Τα παραπάνω μικρά μη κωδικά μόρια RNAs εκφράζονται στα σπερματοζώαρια και αφορούν στην σπερματογένεση (hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-27a), στην εμβρυϊκή ανάπτυξη (hsa-miR-520) είτε σε σηματοδοτικά μονοπάτια και ογκογένεση (οικογένεια hsa-miR-548) (Boissiere και συν., 2017). (Πίνακας 3).

Σε ασθενείς με ολιγοασθενοζωοσπερμία, φαίνεται ότι έξι miRNAs εμφανίζονται με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Από αυτά, τα hsa-miR-15a, hsa-miR-15b, hsa-miR-30, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p and hsa-miR-193b-5p σχετίζονται με την σπερματογένεση (Boissiere και συν., 2017).

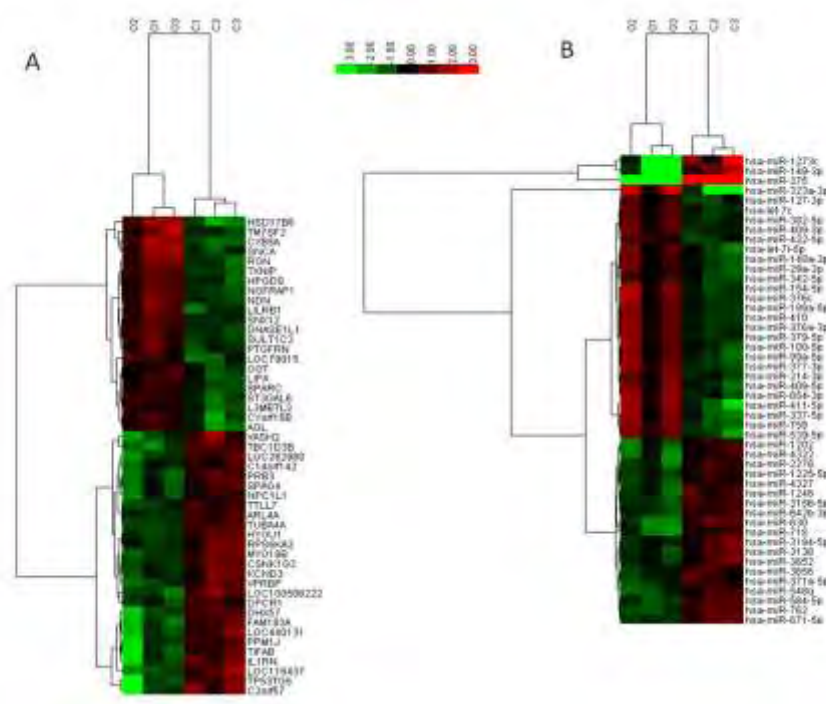
Ο Salas και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που πραγματοποίησαν μελέτη στο προφίλ έκφρασης των miRNAs σε σπερματοζώαρια ασθενών με τερατοζωοσπερμία και ολιγοσπερμία και τα συσχέτισαν με σπερματικές παραμέτρους. Τα δείγματα ασθενών με τερατοζωοσπερμία, οκτώ miRNAs εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης και επτά παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ενώ στους ασθενείς με ολιγοσπερμία, δεκαπέντε miRNAs εμφάνισαν χαμηλή έκφραση και τρία υψηλή (Salas-Huetos και συν., 2015). (Πίνακας 3)

Patients	Samples	miRNA expression	hsa-miRNA	Putative functions
Fertile (controls)	Spermatozoa		miR-34b-3p miR-132-3p miR-191-3p miR-30b-5p, miR-30c-5p, miR-375, miR-19b-3p, miR-200c-3p miR-891a, miR-1233-3p	E2F-pRb regulation Cell cycle progression Sperm differentiation Cancer and aging Unknown biological function
NOA	Testis tissue	Down	miR-1, miR-181a, miR-221, miR-9*, miR-371, miR-372, miR-373	Development of human testis germ cell tumors
Idiopathic infertility (NOA, Asthenozoospermia, Oligozoospermia, Astheno-Oligozoospermia)	Seminal plasma ,Spermatozoa Extracellular Microvesicles Spermatozoa, Extracellular Microvesicles Spermatozoa, Seminal plasma Spermatozoa Spermatozoa Spermatozoa, Extracellular Microvesicles	Up Down Up Up Down	mir-429, miR-1275 miR-15b miR-141 miR-19b [47, 54], miR-483-5p miR-19a [48, 53], miR-1973	Spermatogenesis Embryonic development Unknown Unknown
NOA	Seminal plasma, Spermatozoa, Testis tissue Spermatozoa	Up Down	miR-429 miR-34* , miR-34c-5p, miR-122	Spermatogenesis
Asthenozoospermia	Spermatozoa Spermatozoa Spermatozoa Spermatozoa	Up Up Down Down	miR-27a miR-548b-5p, miR548c-5p, miR-548d-5p miR-34b-3p miR-520 h, miR-520d-3p	Signaling pathway Spermatogenesis Embryonic development
Oligo-Astheno-Zoospermia	Spermatozoa	Down	miR-15a, miR-15b, miR-30, miR-34b, miR-34c-5p, miR-193-5p	Spermatogenesis
Oligozoospermia and Teratozoospermia	Spermatozoa	Down	miR-151-5p miR-935, miR-125a-3p miR-132-5p, miR-320b, miR-195-5p [47]	Aging Cell cycle and chromatin modification Cellular component morphogenesis and cell morphogenesis

Πίνακας 3. Τα miRNAs που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα και οι λειτουργίες στις οποίες αυτά συμμετέχουν

(A. Boissière, A. Gala, A. Ferrières-Hoa, T. Mullet, S. Baillet, A. Petiton, A. Torre and S. Hamamah. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility. Boissière και συν.. Basic and Clinical Andrology (2017) 27:7)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του Li Z και των συνεργατών του, οι οποίοι πρώτοι συσχέτισαν την ελαττωμένη έκφραση του PLCXD3 με την επίδραση σε αυτό του miR-34c-3p στα γεννητικά κύτταρα του όρχι σε άνθρωπο και ποντίκι (Li και συν., 2016). Στη μελέτη αυτή εφαρμόστηκε η μέθοδος microarray προκειμένου να διερευνηθούν τα προφίλ έκφρασης των miRNAs και των mRNAs σε δείγματα από όρχεις ασθενών με ολιγοσπερμία (συγκέντρωση σπέρματος  $< 5 \times 10^6/\text{mL}$ ). Ως δείγματα control χρησιμοποιήθηκε ορχικός ιστός από ασθενείς, οι οποίοι εμφάνιζαν αποφρακτική αζωοσπερμία αλλά είχε διαπιστωθεί ιστολογικά φυσιολογική σπερματογένεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 560 γονίδια υπερεκφράζονταν ενώ 679 γονίδια παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ αντίστοιχα 18 miRNAs παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση ενώ 15 mi-RNAs χαμηλότερη. Η cluster analysis απεκάλυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στα προφίλ έκφρασης ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών όπως φαίνεται και στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Clustering των mRNAs (A) και των miRNAs (B) σε δείγματα ορχικού ιστού μεταξύ ασθενών με ολιγοσπερμία (O) (n=3) και αποφρακτική αζωοσπερμία (C)(n=3)

Το χρώμα στα κουτιά υποδεικνύει τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs και mRNAs, τα οποία παρουσιάζονται αυξημένα περνώντας προς το κόκκινο χρώμα

Το σκούρο χρώμα δείχνει ότι τα προφίλ έκφρασης στις δύο ομάδες εμφανίζει ομοιότητα.

( Li, Z. και συν.. (2016). Integrated analysis miRNA and mRNA profiling in patients with severe oligozoospermia reveals miR-34c-3p downregulates PLCXD3 expression. *Oncotarget*, 7(33), 52781–52796. )

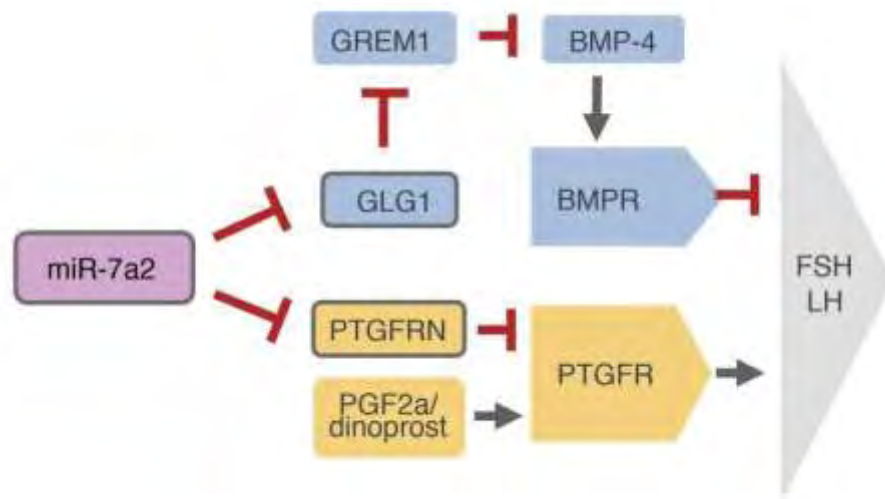
Για να αποκαλυφθεί η λειτουργία των παραπάνω γονιδίων πραγματοποιήθηκε οντολογική ανάλυση γονιδίων (gene ontology analysis), όπου και διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια που παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενέχονται κυρίως στην κίνηση των μικροσωληνίσκων, στη γλυκόλυση, στην κίνηση μαστιγίων, στην ωρίμανση των κυττάρων, στη βιοσύνθεση αμινοξέων ενώ αυτά που υπερεκφράζονται αφορούν σε καταβολικές διαδικασίες, στην οξείδωση και στην ρύθμιση έκκρισης της ιντερλευκίνης 10 (Li και συν., 2016). Επίσης, μεταξύ των γονιδίων χαμηλής έκφρασης φαίνεται ότι περιλαμβάνονται γονίδια που συμμετέχουν σε 24 KEGG μονοπάτια (FDR p-value<0.05), μεταξύ των οποίων το Jak-STAT σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο πιθανά και σχετίζεται με την ολιγοσπερμία (Li και συν., 2016).

Προκειμένου να αναγνωριστούν τα πιθανά ζεύγη miRNA-γονίδιο στόχος χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι MiRanda, Pictar, Microna.org, PITA κ.α. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι η φωσφωλιπάση PLCXD3 αποτελεί πιθανά στόχο του miR-34c-3p. Το γονίδιο PLCXD3 αποτελεί μέλος της οικογένειας PLCXD που κωδικοποιούν για τα ένζυμα Phosphatidylinositol-specific φωσφολιπάσες C. Η πρωτεΐνη PLCXD3 είναι υψηλά συντηρημένη στα διάφορα είδη και με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικών μεθόδων διαπιστώθηκε έντονη εντόπιση στις μικρολάχνες τις επιδιδυμίδας. Η πρωτεΐνη PLCXD3 πιθανά σχετίζεται με τη μεταφορά νερού ή διαλυτών σε αυτά τα κύτταρα, η οποία, ως γνωστόν, είναι απαραίτητη στη σπερματογένεση. Επίσης, η παραπάνω πρωτεΐνη είναι παρούσα στα σπερματογόνια και στα σπερματοκύτταρα χωρίς να είναι γνωστός ο ρόλος της σε αυτά. Το miR-34 παρατηρήθηκε κατά τα τελευταία στάδια της μείωσης (παχυταινικά σπερματοκύτταρα και σφαιρικές σπερματίδες) και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης στους ολιγοσπερμικούς ασθενείς, πιθανά, να σχετίζονται με την αδυναμία διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων. Έτσι, τα επίπεδα έκφρασης του miR-34-3p, ενδεχομένως, να αποτελέσουν διαγνωστικό βιοδείκτη για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία και μη αποφρακτική αζωοσπερμία (Li και συν., 2016).

Στη περίπτωση του υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού, βρέθηκε ότι το miR-7a2, μέλος μιας οικογένειας νευροενδοκρινών miRNAs (miR-7), είναι απαραίτητο για τη σωστή ανάπτυξη της υπόφυσης και τη σωστή λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων κατά την ενήλικη ζωή. Η έλλειψη του miR-7a2 προκαλεί υπογονιμότητα, με χαμηλά επίπεδα των γοναδοτροπινών και των φυλετικών ορμονών, και μικρούς όρχεις ή ωοθήκες. Στην παραπάνω μελέτη ο Ahmed και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι το miR-7a2 παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στην υπόφυση, όπου και προκαλεί αναστολή

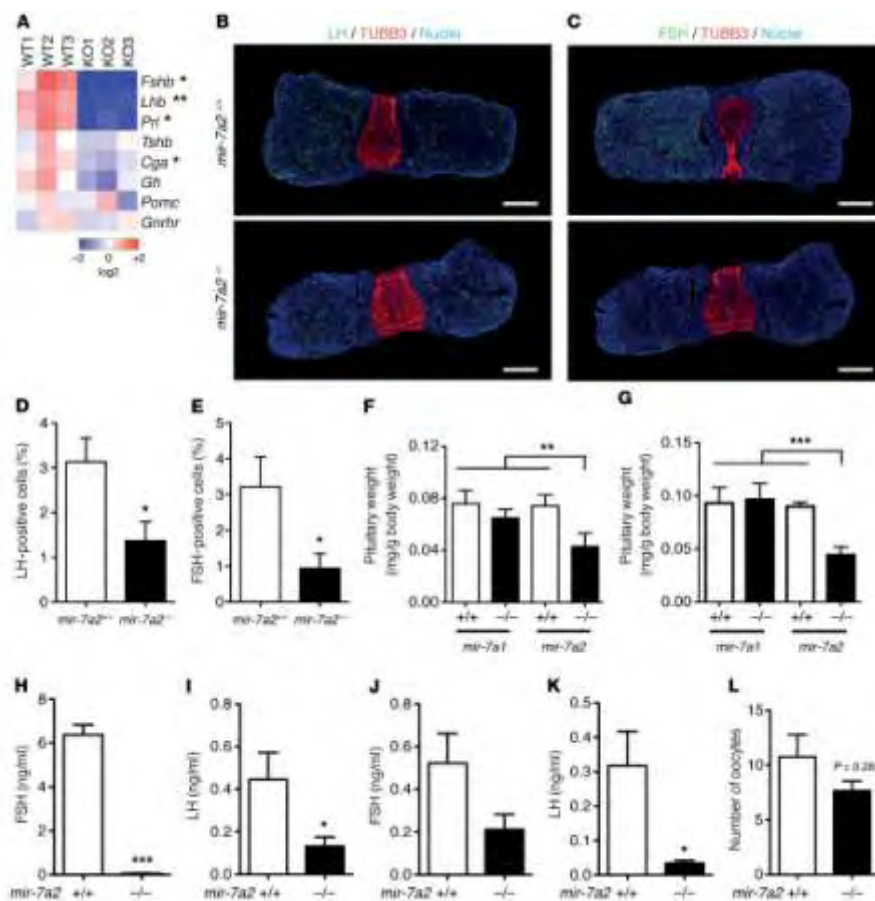


έκφρασης της golgi glycoprotein 1 (GLG1) καθώς και αποσιώπηση του μονοπατιού της bone morphogenetic protein 4 (BMP4), η οποία αναστέλλει τη σύνθεση της FSH, ενώ επηρεάζει και τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα prostaglandin F2a receptor regulator (PTGFRN) (Εικόνα 12) Φαίνεται λοιπόν ότι το miR-7a2 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ωρίμανση του γεννητικού συστήματος καθώς και στη ρύθμιση της σύνθεσης της FSH και LH (Ahmed και συν., 2017).



Εικόνα 12. Τα μοριακά μονοπάτια ρύθμισης των LH και FSH στην υπόφυση. (Ahmed K. και συν.. Loss of microRNA-7a2 induces hypogonadotropic hypogonadism and infertility *J Clin Invest.* 2017;127(3):1061-1074)

Στην εικόνα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από πειράματα απαλοιφής του mir-7a2 σε ποντίκια. Είναι φανερό ότι τα knockout ποντίκια παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα ορμονών της υπόφυσης σε σχέση με τα control mice, όπως προκύπτει από την heat map analysis ενώ και η ίδια η υπόφυση εμφανίζει μικρότερο μέγεθος (Ahmed και συν., 2017).



Εικόνα 13. Πειράματα απαλοιφής του *mir-7a2* προκαλούν υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό. (Ahmed K... Latreille M., Stoffel M. Loss of microRNA-7a2 induces hypogonadotropic hypogonadism and infertility *J Clin Invest.* 2017;127(3):1061-1074)

## 2.3 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNAs ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Όπως προκύπτει από όλα τα προηγούμενα, τα παραπάνω μικρά μη κωδικά μόρια RNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας με διάφορα φυσιοπαθολογικά αίτια.

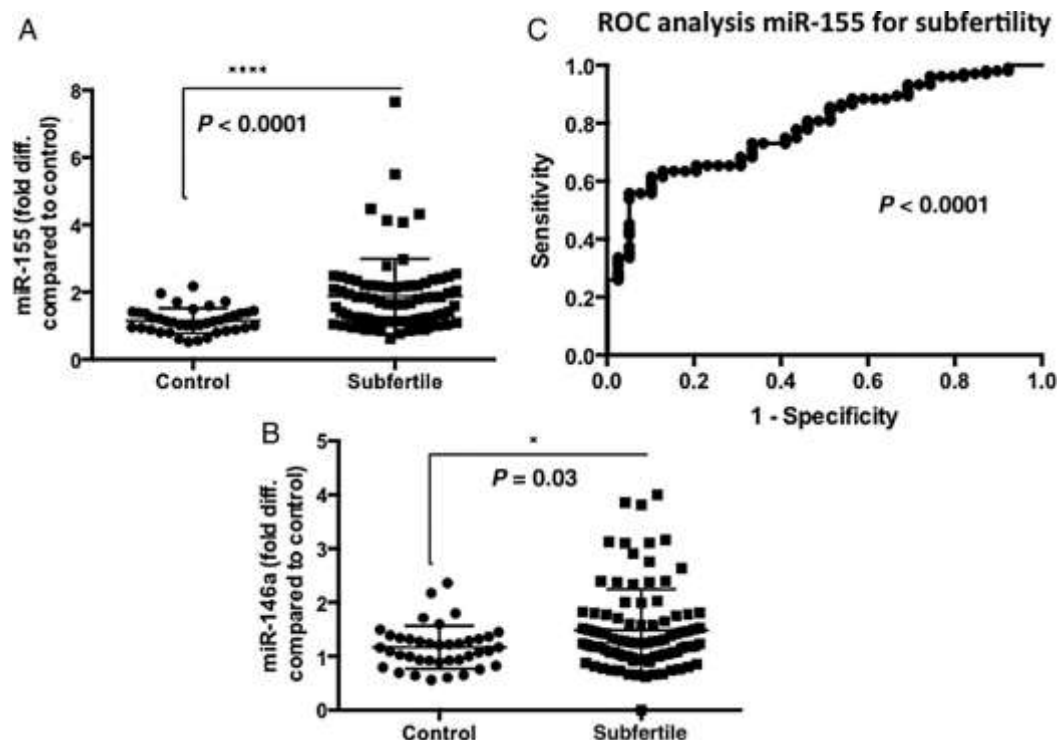
Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια πρόσφατη μελέτη, η οποία δείχνει ότι το *hsa-miR-210* σχετίζεται με την σπερματογένεση και παρουσιάζει υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA). Η έκφρασή του διεγείρεται από την υποξία και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανταπόκριση του κυττάρου σε αυτή. Στη μελέτη αυτή



δείχτηκε ότι το miR-210 στοχεύει απευθείας στον παράγοντα insulin-like Growth Factor 2. Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει τη σπερματογένεση μέσω της εν γένει επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων αλλά και ειδικότερα μέσω διέγερσης της σύνθεσης DNA στα σπερματογόνια, καθώς και κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Sertoli. Η ανακάλυψη του mRNA-στόχου προέκυψε με τη βοήθεια βιοπληροφορικών μελετών συσχέτισης (Target Scan Database) καθώς και με τη χρήση miR-210-mimics, όπου διαπιστώθηκε ότι η επίδραση τέτοιων μορίων σε κύτταρα καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων του IGF2. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων το hsa-miR-210 προτάθηκε ως πιθανός βιοδείκτης της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας (NOA), γεγονός που ενδεχόμενα θα οδηγήσει στην ανακάλυψη μιας νέας μη επεμβατικής μεθόδου για την ακριβή διάγνωση της παραπάνω κατάστασης και την ανώδυνη διάκριση της από την αποφρακτική αζωοσπερμία (Tang και συν., 2016).

Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα επίπεδα του hsa-miR-34c στα σπερματοζωάρια σχετίζονται με την επιτυχή έκβαση της μεθόδου intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) κατά τη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης (Cui και συν., 2015). Ειδικότερα, τα ποσοστά των καλής ποιότητας εμβρύων τρίτης ημέρας είναι υψηλότερα σε άτομα με υψηλά επίπεδα του hsa-miR-34c, επομένως το παραπάνω miRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης αναγνώρισης κατάλληλων σπερματοζωαρίων (Cui και συν., 2015).

Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Tsatsanis και συν. έδειξαν ότι τα επίπεδα του miR-155, το οποίο σχετίζεται με τη φλεγμονή, σε συνδυασμό με τα επίπεδα της FSH στον ορό αίματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτης για την ανίχνευση της ανδρικής υπογονιμότητας με 80% ευαισθησία και 100% ειδικότητα (Tsatsanis και συν., 2015) (Εικόνα 14). Η έκφραση του miR-155, φαίνεται ότι επάγεται από τα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα και ο ρόλος του στα κυκλοφορούντα εξωσώματα ίσως αφορά τη μεταφορά ενδοκρινών μηνυμάτων (Tsatsanis και συν., 2015). Τα αυξημένα επίπεδα του miR-155 στο αίμα ανδρών με υπογονιμότητα ενδεχομένως να σχετίζονται με βλάβες στον αιματο-ορχικό φραγμό είτε να διαδραματίζουν λειτουργικό ρόλο στη σπερματογένεση, αλλά ο ακριβής του ρόλος στην ανδρική υπογονιμότητα δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Tsatsanis και συν., 2015).



Εικόνα 14. Συσχέτιση του miR-155 με την ανδρική υπογονιμότητα (Tsatsanis C. και συν.. Serum miR-155 as a potential biomarker of male fertility, *Human Reproduction*, Volume 30, Issue 4, 1 April 2015, Pages 853–860)

Λαμβάνοντας υπόψιν την σημασία των μικρών μη κωδικών μορίων στην σπερματογένεση, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι πολυμορφισμοί τόσο στα ίδια τα microRNAs, όσο και σε αλληλουχίες σχετιζόμενων γονιδίων που αφορούν σε περιοχές πρόσδεσης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs, μπορεί να οδηγούν σε υπογονιμότητα.

Ο Zhang και οι συνεργάτες του παρατήρησαν μια τέτοια συσχέτιση ανάμεσα σε 6 single nucleotide polymorphisms (SNPs) στα γονίδια CYP19, Serpina5, CGA, CPEB1 και CPEB2. Οι πολυμορφισμοί αυτοί παρατηρούνται στην 3' UTR περιοχή, στα σημεία πρόσδεσης του miR-1302 και επηρεάζουν την ικανότητα σύνδεσης του με το mRNA-στόχο, προκαλώντας έτσι προβλήματα γονιμότητας (Zhang και συν., 2011). Η επίδραση αυτών των SNPs στην ανδρική γονιμότητα μελετήθηκε σε μια case-control μελέτη όπου διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση μια αδενίνης (A) από μια θυμίνη (T) στη θέση rs6631 του γονιδίου CGA, οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης του miR-1302, με αποτέλεσμα

την υπερέκφραση του CGA. Η υπερέκφραση του CGA δημιουργεί προβλήματα στην σπερματογένεση και ανδρική υπογονιμότητα.

Επιπλέον, σε μια μελέτη για την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα στον κινέζικο πληθυσμό Han, διαπιστώθηκε ότι πολυμορφισμοί στη θέση rs11614913 του *hsa-miR-196a-2* (TT vs. CT:  $P=0.014$ ; TT vs. CC:  $P=0.005$ ; TT vs. CT + CC:  $P=0.003$ ) σε πλάσμα σπέρματος παρουσίαζαν υψηλή συσχέτιση με προβλήματα γονιμότητας και αύξαναν τον κίνδυνο για ασθενοσπερμία, ολιγοσπερμία και αζωοσπερμία. Σε περαιτέρω ανάλυση συσχέτισης γενοτύπου – έκφρασης προέκυψε ότι ο πολυμορφισμός rs11614913 CC σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του *hsa-miR-196a-5p* ( $P<0.05$ ), η οποία αυξάνει τα επίπεδα απόπτωσης των γεννητικών κυττάρων (Lu και συν., 2016). Επομένως, τέτοιου είδους πολυμορφισμοί θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτες υπογονιμότητας.

Παρόλο το πλήθος των μελετών στο παρόν πεδίο, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για κυκλοφορούντα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs, τα οποία να σχετίζονται με την σπερματογένεση και την ανδρική υπογονιμότητα. Το κενό αυτό αποτελεί μια πρόκληση για μελλοντικές μελέτες, ενώ η περαιτέρω κατανόηση των μοριακών μηχανισμών δράσης των miRNAs στη σπερματογένεση και ο σχεδιασμός υπολογιστικών δικτύων να αποτελέσουν την απαρχή για την κατασκευή θεραπευτικών μορίων για την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας.

### 3. ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες γυναίκες έρχονται αντιμέτωπες με προβλήματα που οδηγούν σε μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα. Το συνηθέστερα αίτια είναι η προχωρημένη αναπαραγωγική ηλικία, οι ορμονικές και μεταβολικές διαταραχές, γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες, η παχυσαρκία, διάφορες λοιμώξεις και περιβαλλοντικοί παράγοντες, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η πρόωρη ωοθηλακική ανεπάρκεια, η αδυναμία εμφύτευσης του εμβρύου και η ενδομητρίωση (Hart, 2016).

Στις επόμενες παραγράφους θα αναφερθούν οι κυριότερες γενετικές και επιγενετικές αιτίες που έχουν συσχετιστεί με τη γυναικεία υπογονιμότητα και την ανώμαλη ωογένεση, ενώ θα γίνει προσπάθεια να αναλυθεί σε βάθος ο ρόλος των μικρών μη κωδικών μορίων miRNAs στη μεταμεταφραστική ρύθμιση γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με συγκεκριμένες ασθένειες. Προκειμένου να γίνει καλύτερα κατανοητός ο τρόπος με τον

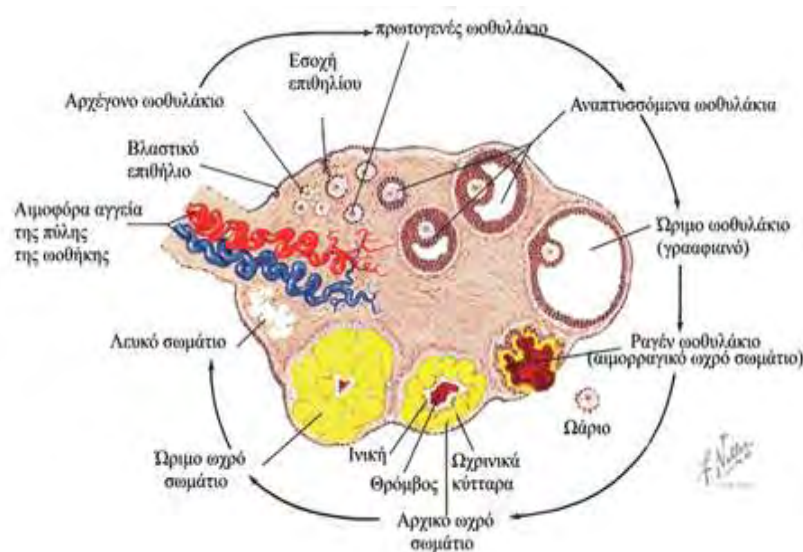
οποίο κάποιο από αυτούς προκαλούν δυσλειτουργία στην γαμετογένεση, θα πραγματοποιηθεί ,επίσης, μια σύντομη περιγραφή των σταδίων δημιουργίας των σπερματοζωαρίων.

### 3.1 ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Η ωογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού ενός ώριμου ωαρίου. Στα θηλαστικά, η πρώτη φάση της αυτής της διαδικασίας ξεκινά στο γεννητικό επιθήλιο, το οποίο με τη σειρά του θα δώσει γένεση στα ωογόνια (θηλυκά βλαστικά γεννητικά κύτταρα) και τα οποία τελικά θα εξελιχθούν στα ώριμα ωάρια. Τα ωογόνια, από τις πρώτες κιόλας εβδομάδες της εμβρυικής ζωής, πολλαπλασιάζονται μιτωτικά με αποτέλεσμα μια μεγάλη αύξηση του αριθμού τους. Πριν τη γέννηση, παρατηρείται σημαντική εκφύλιση των ωογονίων (ατρησία ωογονίων), η οποία επιτυγχάνεται μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης, και οδηγεί σε μείωση του συνολικού αριθμού τους. Η περεταίρω ανάπτυξη των ωογονίων δημιουργεί τα πρωτογενή ωοκύτταρα, τα οποία είναι περίπου 2 εκατομμύρια κατά τη γέννηση. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα μαζί με τα κοκκιώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν αποτελούν τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Σε αντίθεση με την παραγωγή των σπερματοκυττάρων, πρωτογενή ωοκύτταρα δε σχηματίζονται μετά τη γέννηση των θήλεων ατόμων. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα ξεκινούν την πρώτη μειωτική διαίρεση πριν τη γέννηση αλλά δεν ολοκληρώνουν την πρόφαση μέχρι μετά την εφηβεία (παραμένουν στο στάδιο της διπλοταινίας). (Εικόνα 14)

Τα πρωτογενή ωοκύτταρα (αρχέγονα ωοθυλάκια) κατά την εφηβεία αυξάνουν σε μέγεθος και αναπτύσσουν γύρω τους μία διαφανή μεμβράνη που ονομάζεται *zona pellucida*. Τα ωοθυλάκια, τα οποία περιλαμβάνουν τα ωοκύτταρα και τα παρακείμενα κοκκιώδη κύτταρα (granulosa cells), εμφανίζουν, κατά τη διάρκεια της ωοθηλακικής ανάπτυξης, μια πολύπλοκη παρακρινή αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων που τα απαρτίζουν. Μέχρι την εμφάνιση του άντρου, η έναρξη της ωρίμανσης των ωοθυλακίων ελέγχεται και κατευθύνεται από ενδοωοθηλικούς παράγοντες και δεν επηρεάζεται από τις γοναδοτροπίνες FSH και LH.(Εικόνα 11). Η παρουσία της LH σηματοδοτεί τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και κυτοκινών, μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεΐνες μετασχηματισμού της μήτρας των κοκκιωδών κυττάρων (Christensen και συν., 2012).

Οι διαδικασίες της ωοθηλακιογένεσης και της στεροειδογένεσης είναι ιδιαίτερα περίπλοκες και απαιτούν την έκφραση πολλών γονιδίων στο ωοθηκικό περιβάλλον καθώς και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών και τη διαμεσολάβηση ενδοκρινών και παρακρινών παραγόντων. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PTEN/PI3K/Akt συμβάλει στον πολλαπλασιασμό των ωοκυττάρων, στην επιβίωση, στη μετανάστευση και τον μεταβολισμό τους, ενώ ο παράγοντας WNT4 απαιτείται για την ανάπτυξη του άντρου (Lund και συν., 2004).



Εικόνα 14. Η δομή της ωοθήκης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ωοθηλακίου. (gr.dreamstime.com)

Μία μέρα πριν την ωορρηξία, το πρωτογενές ωοκύτταρο ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεση, κάτω από την επίδραση των γοναδοτροπινών. Η διαίρεση αυτή είναι ανομοιόμορφη σε ότι αφορά το κυτταρόπλασμα και δίνει γένεση στο δευτερογενές ωοκύτταρο και το πολικό σωματίο (μικρό μη λειτουργικό κύτταρο που σταδιακά αποικοδομείται). Κατά την ωορρηξία, ο πυρήνας του δευτερογενούς ωοκυττάρου ξεκινά τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, η οποία εξελίσσεται μέχρι το στάδιο της μετάφασης. Στο στάδιο αυτό η κυτταρική διαίρεση αναστέλλεται και ολοκληρώνεται μόνο μετά τη γονιμοποίηση (όπου και πάλι η διαίρεση του κυτταροπλάσματος δεν είναι ομοιόμορφη και το σύνολο σχεδόν του κυτταροπλάσματος παραμένει στο ώριμο ωοκύτταρο) (Εικόνα 15).

Στον άνθρωπο, η εξέλιξη του αρχέγονου ωοθηλακίου προς ώριμο ωάριο διαρκεί περίπου 120 μέρες (Johnson & Everitt, 2000).

## **3.2 ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ**

### **3.2.1 Χρωμοσωματικές ανωμαλίες**

Όπως και στους άντρες, τόσο οι αριθμητικές, όσο και οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες έχουν επιπτώσεις στη γυναικεία γονιμότητα. Στις γυναίκες, η μονοσωμία του φυλετικού χρωματοσώματος X (45,X), κλινική εκδήλωση του οποίου αποτελεί το σύνδρομο Turner, καθώς και η παρουσία ενός επιπλέον χρωματοσώματος X (47,XXX) επηρεάζουν τη γονιμότητα. Από τις δομικές αναδιατάξεις των χρωμοσωμάτων οι αμοιβαίες μεταθέσεις είναι εκείνες οι οποίες σχετίζονται συχνότερα, τόσο με τη γυναικεία, όσο και με την ανδρική υπογονιμότητα και τις καθ' ἑξίν αποβολές, όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα (Gardner & Sutherland, 2004).

### **3.2.2 Γονιδιακές μεταλλάξεις**

Πολλά γονίδια έχουν συσχετιστεί με την γυναικεία υπογονιμότητα και αφορούν σε διάφορες ασθένειες, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα, μεταξύ άλλων, την αναπαραγωγική δυσλειτουργία. Οι κυριότερες από τις ασθένειες αυτές είναι οι εξής:

#### Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (POF: Premature Ovarian Failure)

Η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια είναι μια διαταραχή των ωοθηκών σε γυναίκες με ηλικία μικρότερη των 40 ετών με πολυπαραγοντική αιτιολογία και χαρακτηρίζεται από αμηνόρροια, υπεργοναδοτροπισμό και υποοιστρονισμό. Οι κυριότερες γενετικές αιτίες είναι οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες, η γαλακτοζαιμία, οι μεταλλάξεις στον υποδοχέα της FSH και στον υποδοχέα της LH και τέλος η προμετάλλαξη ευθραύστου X (FMR1 premutation) (Poongothai και συν., 2009). Η τελευταία αποτελεί και τη συχνότερα απαντώμενη γνωστή αιτία της POF έπειτα από τις χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Η προμετάλλαξη οφείλεται σε επέκταση μιας τριπλέτας CGG σε 50-200 αντίγραφα στο 5' άκρο του γονιδίου FMR1, ενώ η επέκταση του γονιδίου σε περισσότερα από 200 αντίγραφα



προκαλεί το σύνδρομο ευθραύστου X (Gunes και συν., 2016). Η προμετάλλαξη αυτή θα προκαλέσει πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια στο 13-20% των γυναικών που τη φέρουν.

#### Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS: polycystic ovarian syndrome)

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι το πιο κοινή, αν και ετερογενής, ενδοκρινική διαταραχή σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας με υψηλό επιπολασμό (5-15%) και σημαντικό κοινωνικοοικονομικό κόστος. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από πολυκυστικές ωοθήκες, χρόνια διαταραχή εμμηνορρυσίας, η οποία περιλαμβάνει ολιγοωοθυλακιορρηξία ή ανωοθυλακιορρηξία, υπερανδρογοναιμία, χρόνια φλεγμονή και αυξημένο κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2. Τα αίτια του συνδρόμου αυτού δεν είναι ακόμη ξεκάθαρα αλλά φαίνεται πως συμβάλλουν τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Για την παρουσία του παραπάνω συνδρόμου έχουν ενοχοποιηθεί 50 γονίδια τα οποία αφορούν κυρίως στην ωογένεση, στην έκκριση και την ενεργότητα της ινσουλίνης, καθώς και στην βιοσύνθεση των ανδρογόνων. Το πιο πιθανό γονίδιο, η μετάλλαξη του οποίου οδηγεί στην εμφάνιση του συνδρόμου είναι το FBN3, υπεύθυνο για την παραγωγή φιμπριλλίνης 3 (Layman και συν., 2013).

#### Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός και σύνδρομο Kallman

Όπως στα άρρενα, έτσι και στα θήλεα άτομα, ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός και το σύνδρομο *Kallman* (με μικρότερη συχνότητα 1:50000 άτομα), αποτελεί αιτία υπογονιμότητας εξαιτίας της πρωτοπαθούς αμηνόρροιας που προκαλεί<sup>83</sup>. Τα κυριότερα γονίδια, στα οποία οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε είναι τα *KAL1*, *KAL2* και *GNRHR gene* (Layman και συν., 2013).

#### Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση καθορίζεται από την παρουσία αδένων και στρώματος του ενδομητρίου σε περιοχές έξω από τη μήτρα. Περίπου το 6-10% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας πάσχουν από έντονους πόνους εμμήνου ρήσεως, χρόνιους πόνους στην περιοχή της λεκάνης καθώς και υπογονιμότητα, ως αποτέλεσμα της ενδομητρίωσης.

Πρόκειται για μια πολύπλοκη ασθένεια με την οποία δεν έχουν συσχετιστεί συγκεκριμένες μεταλλαγές γονιδίων αλλά από μελέτες συσχέτισης έχουν βρεθεί γενετικοί τόποι, οι οποίοι, πιθανά, εμπεριέχουν σχετιζόμενα γονίδια. Μεταξύ άλλων σε αυτούς περιλαμβάνονται οι περιοχές 10q26, 20p13, 1p36 κ.α. (Layman και συν., 2013).

### 3.2.3 Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στη γυναικεία υπογονιμότητα

Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στην γυναικεία υπογονιμότητα είναι πολύπλοκος και λιγότερο μελετημένος. Έχει βρεθεί ότι υπογονιμότητα σχετιζόμενη με την ενδομητρίωση σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του γονιδίου HOXA10, εξαιτίας υπερμεθυλίωσης στο ενδομήτριο ασθενών κατά τη μέση ωχρινική φάση (Szczepanska και συν., 2012) ενώ η εμφάνιση ωθητικής ενδομητρίωσης φαίνεται να σχετίζεται με συγκεκριμένα προφίλ μεθυλίωσης του DNA στο ενδομητρίωμα (Borghese και συν., 2012).

Σε σχέση με την τροποποίηση των ιστονών, μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση νεογνών ποντικών σε οιστρογόνα μεταβάλλει την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την τροποποίηση της χρωματίνης και αλλάζει μόνιμα την επιγενετική σφραγίδα στον γενετικό τόπο Six1, οδηγώντας σε υπογονιμότητα κατά την ενήλικη ζωή και σε καρκίνο του ενδομητρίου (Jefferson και συν., 2013).

Η μετα-μεταφραστική επιγενετική ρύθμιση μέσω των μικρών μη κωδικών μορίων είναι καλύτερα μελετημένη και σε αυτή θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω, τόσο σε σχέση με τη φυσιολογική ωθηλακική λειτουργία όσο και με την διαφοροποίηση τους σε παθολογικές καταστάσεις.

### 3.2.4 Τα MicroRNAs και η ωθητική λειτουργία

Είναι φανερό ότι η παραγωγή ενός ώριμου ωαρίου αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία διαδοχικών σταδίων αυστηρά καθορισμένων χρονικά και απαιτεί συντονισμένες ενέργειες πολλαπλών ιστών και οργάνων (όπως ο υποθάλαμος, η υπόφυση, η ωθήκη). Η ισορροπία αυτού του φαινομένου εξαρτάται εν πολλοίς από την υψηλή ευαισθησία του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος σε ορμονικές μεταβολές και εξωτερικά ερεθίσματα.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα micro-RNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ενδοκρινών λειτουργιών και αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα μικρών RNA που απαντώνται στην ωθήκη (Imbar & Eisenberg, 2014). Ο Timoneda και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μια μελέτη έκφρασης των μη κωδικών μορίων RNAs σε ωθήκες χοίρων, όπου και διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα των let-7a, miR-25 και miR-106a (Timoneda και συν., 2012). Σε μια άλλη μελέτη διαπιστώθηκαν υψηλά ποσοστά των miR-21-5p, miR-143-3p και μέλη της οικογένειας των let-7 στην ωθήκη χοίρων, ενώ η ίδια



μελέτη πρότεινε το διαχειριστικό ρόλο (housekeeping) των συγκεκριμένων miRNAs κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της ίδιας της ωοθήκης (Li και συν., 2015). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα miR-378, miR-1, miR-206, miR-379, miR-127, miR-411 εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στην ωοθήκη σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης των ίδιων miRNAs στους όρχεις, ενώ αντίθετα τα miR-10b, miR-26a, miR-21, miR-140, and miR-101 παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στην ωοθήκη και χαμηλά στους όρχεις. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πολλά από τα γονίδια των προαναφερθέντων miRNAs, τα οποία εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην ωοθήκη, εδράζονται στο χρωμόσωμα X (X-linked miRNAs). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, ανεξάρτητα από το ζωικό είδος, η οικογένεια των let-7 και τα miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143 και miR-145 αποτελούν τους επικρατέστερους πληθυσμούς μικρών μη κωδικών μορίων RNAs στην ωοθήκη (Li και συν., 2015).

Η έκφραση των μικρών μη κωδικών μορίων είναι ειδική για κάθε όργανο και σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία του οργάνου αυτού. Η ωοθήκη, όπως αναφέρθηκε, περιέχει διάφορους τύπους κυττάρων όπως τα κοκκιώδη κύτταρα, τα ωκύτταρα, τα κύτταρα της θήκης. Η έκφραση και η λειτουργία των miRNAs είναι συγκεκριμένη για κάθε τύπο κυττάρου, όπως φαίνεται και στον πίνακα 4. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μελέτες υποδεικνύουν τη μητρική κληρονομία miRNAs, τα οποία εμφανίζονται σε υψηλά ποσοστά στα πρωτογενή ωκύτταρα και τα οποία πιθανά σχετίζονται με την ενεργοποίηση των γονιδίων κατά τη διάρκεια του ζυγωτού (Li και συν., 2015).

miRNAs	Spec	Regulation	Target genes	Functions
<b>Granulosa cells</b>				
miR-503	Mouse	Stimulation by gonadotrophins; Down-regulated during FSH-responsive follicular development stage and luteinization; Up-regulated during later stage before ovulation	<i>ACTRIIa; ACTRIIb; FSHR; BCL2; CCND2</i>	GC proliferation and luteinization
miR-21; miR-132 miR-212; miR-224	Equine	Up-regulated by hCG	<i>PTEN; RASAI; SMAD4</i>	Regulation of steroidogenesis and ovulation
miR-10a; miR-105 miR-182; miR-15a	Human Rat	miR-182: Up-regulated by cAMP agonist	<i>CyclinB1; TdT; Caspase-3; PCNA</i>	Involve in GC proliferation and apoptosis
miR-224	Mouse	Up-regulated by TGF-β1/SMAD pathway	<i>SMAD4</i>	TGF-β1-mediated GC growth and E2 production
miR-23a	Human	Caspase-3 dependent apoptosis pathway	<i>XIAP; Caspase-3</i>	Pro-apoptotic role
miR-383	Mouse	Down-regulated by TGF-β1 and transcription factor steroidogenic factor-1 (SF-1)	<i>RBMS1</i>	Promote steroidogenesis in GC

miR-320	Mouse	Down-regulated by TGF-β1, FSH, and pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)	<i>E2F1</i> <i>SF-1</i>	Inhibit E2 synthesis and GC proliferation; Promotion of T and P synthesis
miR-29a miR-30d	Rat	Down-regulation after FSH treatment for 12 hours and up-regulation after FSH treatment for 48 hours	<i>COL4A1</i> ; <i>BMF</i> <i>RNF2</i> ; <i>EED</i>	Involvement in FSH-induced progesterone production
miR-145	Mouse	-	<i>ACVR1B</i>	Suppress GC proliferation
miR-21	Mouse Human	Up-regulated by hCG/LH	<i>COL4A1</i>	Anti-apoptosis role in GC; Regulate COL4A1 synthesis
miR-132 miR-214	Rat	down-regulated by cAMP agonist(miR-132); up-regulated by cAMP agonist(miR-214)	<i>SREBP-1c</i> <i>LDLR</i>	Lipid metabolism /steroidogenesis in rat GC
miR-181a	Mouse	-	<i>ACVR1A</i>	Supress GC proliferation
miR-125b	Human Mouse	induced by dihydrotestoster-1 and testosterone	<i>BAK</i> ; <i>BAX</i> <i>BMF</i> ; <i>TP53</i>	Suppression of proapoptotic protein expression in GCs
let-7 family; miR-21; miR-143; miR-125b;	Mouse	Housekeeping Regulated by FSH treatment;	-	Follicle development
iR-26b	Pig		<i>ATM</i>	Pro-apoptotic role

## Oocytes

miR-184; miR-10a miR-100	Human	-	<i>SMARCA5</i> <i>NCOR2</i> ; <i>HOXA1</i>	Oocyte reprogramming; Repression nuclear receptors; Regulation of oocyte-specific gene expression
miR-224	Mouse	Up-regulated by TGF-β1 and EGF	<i>PTX3</i>	Cumulus expansion in EGF-stimulated COCs
miR-205 miR-150 miR-122; miR-96, miR-146a; iR-146b-5p	Bovine	Dynamic degradation during oocyte maturation	-	Oocyte maturation
miR-335-5p	Mouse	At high level mainly during the meiotic Maturation period; Decreased significantly shortly after fertilization	<i>Daam1</i> ; <i>ERK1/2</i> <i>Mitogen-activated protein kinase pathway</i>	Oocyte meiosis; Cytoskeleton dynamics; Spindle formation
miR-20a; miR-15a miR-602	Human	miR-20a, miR-15a: dynamic changes during meiosis	miR-15a: <i>BCL-2</i> <i>family</i> ; <i>CDC25A</i>	Regulation of cell division and cell growth
let-7b; let-7c miR-27a; miR-322	Mouse	-	<i>IGFBP-2</i>	Regulation of oocyte meiotic competence

Πίνακας 4. Τα μικρά μη κωδικά RNAs που εκφράζονται στα κοκκιώδη κύτταρα (granulosa cells) και τα ωοκύτταρα (Ying Li και συν.. MicroRNAs in ovarian function and disorders. Journal of Ovarian Research (2015) 8:51)

Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο της Dicer RNAασης στα ωοκύτταρα καθώς και στα αρχικά στάδια μετά τη γονιμοποίηση, όπου φαίνεται ότι η ποσότητα της Dicer μειώνεται ραγδαία (Tang και συν., 2007). Σε πειράματα με Knockout ποντίκια για την Dicer1 διαπιστώθηκε μείωση του βάρους της ωοθήκης καθώς και χαμηλότεροι ρυθμοί ωορηξίας (Hong και συν., 2008)<sup>15</sup>.

Πολλές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι συγκεκριμένες ομάδες micro RNA σχετίζονται με την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων και του ωχρού σωματίου, μεταξύ των οποίων τα miR-2, miR-7, miR-184, miR-100, miR-9b, let-7, miR-79, miR-133, miR-275 και miR-252 (Imbar & Eisenberg, 2014). Όπως προκύπτει, στα διάφορα στάδια των ωοκυττάρων, διαφοροποιείται και η έκφραση των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs. Έτσι, τα miR-2 και miR-133 εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στο στάδιο της μετάφρασης I, κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση, σε σχέση με άλλα στάδια και φαίνεται ότι αναστέλλουν τη μετάφραση της κυκλίνης B, μέσω πρόσδεσης στο 3'UTR του mRNA της (Song και συν., 2014).

Τα miRNAs εμπλέκονται σε όλη τη διαδικασία της ωοθηλακικής ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της ωοθηλακικής αύξησης, ατρησίας και ωορρηξίας. Η McBride και οι συνεργάτες της μελέτησαν το προφίλ έκφρασης των miRNAs σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του ωοθηλακίου: μικρά (1.5-3.5 mm), μεσαία (4,0-5.5 mm), πριν την ωορρηξία και κατά την ωχρινική φάση και διαπίστωσαν ότι τα miR-21, miR-125b, let-7a and let-7b παρουσιάζουν τα υψηλότερά επίπεδα έκφρασης σε όλα τα στάδια (McBride και συν., 2012). Παράλληλα, τα miR-199a-3p, miR-145 and miR-31 υπερεκφράζονται κατά την ωοθηλακική φάση και επιδεικνύουν μια ραγδαία πτώση των επιπέδων έκφρασης κατά την μετάβαση στην ωχρινική φάση (McBride και συν., 2012). Αντιθέτως, τα miR-503, miR-21 and miR-142-3p παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης κατά την ωοθηλακική φάση και σημαντική αύξηση κατά την ωχρινική (McBride και συν., 2012).

Επίσης, έχει προταθεί ότι τα miR-132 και miR-212 αποτελούν τους βασικούς παράγοντες μεταμεταφραστικής ρύθμισης στα κοκκιώδη κύτταρα (Fiddler και συν., 2008). Μια μελέτη σε τρωκτικά απεκάλυψε διφασική ρύθμιση των miRNAs από τη FSH και υπέδειξε τα miRNAs ως πιθανούς διαμεσολαβητές για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της παραγωγής ορμονών στα κοκκιώδη κύτταρα μετά την επίδραση της FSH (Yao και συν., 2010).

Τέλος, τα miRNA φαίνεται πως συμμετέχουν στη ρύθμιση της ωοθηκικής στεροειδογένεσης είτε στοχεύοντας ορμονικούς υποδοχείς είτε επηρεάζοντας τη

βιοσύνθεση των ορμονών και την απελευθέρωσή τους. Για παράδειγμα, η οιστραδιόλη (E2) παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθηλακίων και η παραγωγή της ρυθμίζεται από την αρωματάση. Ο Xu και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η έκφραση της αρωματάσης και η σύνθεση της οιστραδιόλης στα κοκκιώδη κύτταρα αναστέλλονται από το miR-378, ενώ η απελευθέρωση της οιστραδιόλης υπόκειται στη ρυθμιστική επίδραση του miR-383 στα κοκκιώδη κύτταρα (Li και συν., 2015).

Όπως είναι φανερό, η σωστή λειτουργία της ωοθήκης, η οποία είναι η βασική λειτουργική δομή του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος αποτελεί μια αυστηρά ενορχηστρωμένη διαδικασία, κατά την οποία τα μικρά μη κωδικά RNAs διαδραματίζουν το ρόλο διακόπτη για τη σωστή μετάβαση από στάδιο σε στάδιο. Διαφοροποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης, καθώς και προβλήματα στη βιογένεσή τους, έχουν συσχετιστεί με τη δυσλειτουργία της ωοθήκης και την γυναικεία υπογονιμότητα.

### **3.3 Micro RNAs και ωοθηκική δυσλειτουργία**

Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs στα κοκκιώδη κύτταρα και τα ωοκύτταρα με την ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων που αφορούν στην ωοθηλακιογένεση και την ωοθηκική στεροειδογένεση, οδήγησε στο ερώτημα πως αυτά μπορεί να διαφοροποιούνται σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την υπογονιμότητα στις γυναίκες, όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovary Syndrome – PCOS), την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (Premature Ovarian Failure- POF) και την ενδομητρίωση .

#### **3.3.1 Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovary Syndrome – PCOS)**

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs με το παραπάνω σύνδρομο μια πρόσφατη μελέτη εξέτασε την έκφραση των miRNAs στον ορό ασθενών με PCOS , κάνοντας χρήση μικροσυστοιχιών, και διαπίστωσε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης 9 miRNAs (miR-222, miR-16, miR-19a, miR-106b, miR-30c, miR-146a,

miR-24, miR-186 και miR-320) σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα (Sorensen και συν., 2014). Από αυτά τα οκτώ παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, ενώ το miR-320 χαμηλότερα επίπεδα. Περαιτέρω στατιστική ανάλυση κατέδειξε ότι τα miR-222, miR-146a και το miR-30c εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση στους ασθενείς με PCOS και επιπλέον ότι ο συνδυασμός των τριών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τη διάγνωση του συνδρόμου με υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας (Sorensen και συν., 2014).

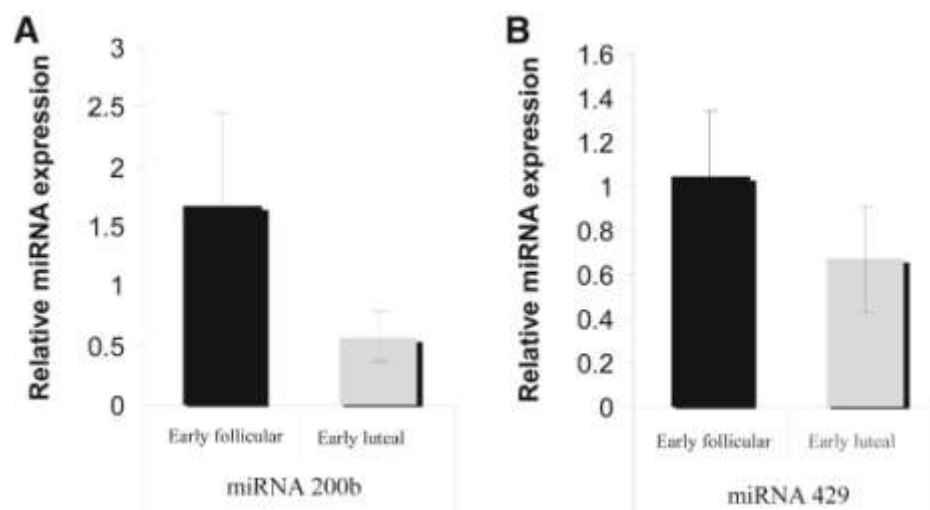
Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μοντέλα αρουραίων με PCOS διαπιστώθηκε διαφοροποίηση στην έκφραση 25 ωοθηκικών miRNAs, τα περισσότερα εκ των οποίων προωθούν την εμφάνιση κυστών και εδράζονται στα κύτταρα της θήκης (Hossain και συν., 2013). Μεταξύ των παραπάνω μη κωδικών RNAs συμπεριλαμβάνεται και το miR-222, το οποίο διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται στα κύτταρα της θήκης και ότι η έκφρασή του αναστέλλεται από τη δράση των ανδρογόνων. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση του miR-222 σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα οιστραδιόλης καθώς και χαμηλή έκφραση των γονιδίων στόχων της (Hossain και συν., 2013).

Ο Sang και οι συνεργάτες του αξιολόγησαν την έκφραση των miRNAs στο ωοθηλακικό υγρό ασθενών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και εντόπισαν πληθώρα miRNAs, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην στεροειδογένεση. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται το miR-132 και το miR-320, τα οποία εμφανίζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα σε σχέση με τα controls υγιή άτομα. Το miR-320, όπως αναφέρθηκε προτύτερα, παρουσιάζεται μειωμένο και στον ορό ασθενών με PCOS.

Μια πρόσφατη μελέτη σε ποντίκια απέδειξε ότι τα miR-429 και miR-200b, μέλη της οικογένειας miRNA 200, επιδρούν ισχυρά στην ωορρηξία. Από πειράματα απαλοιφής των δύο προηγούμενων RNA προέκυψε ότι, έλλειψη τους προκαλεί δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες και αποτυχία ωορρηξίας. Είναι γνωστό, ότι η οικογένεια miRNA 200 συνδέεται με την μεσεγχυματική μετάβαση, η οποία είναι απαραίτητη στο σχηματισμό του ωχρού σωματίου και στην έντονη αγγειογένεση μετά την ωορρηξία. Μέσω αλγορίθμων προέκυψε ότι πιθανοί στόχοι των miR-429 και miR-200b, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια, είναι οι πρωτεΐνες ZEB1 και ZEB2. Στα ποντίκια, η πρωτεΐνη ZEB1 αποτελεί πυρηνικό αναστολέα του γονιδίου της LH, η οποία είναι απαραίτητη για την ωορρηξία. Τα παραπάνω micro RNAs εμφανίζονται και στον άνθρωπο, ενώ το γονίδιο της LH φαίνεται να παρουσιάζει περιοχές πρόσδεσης του ZEB1 (Hidetoshi και συν., 2013,

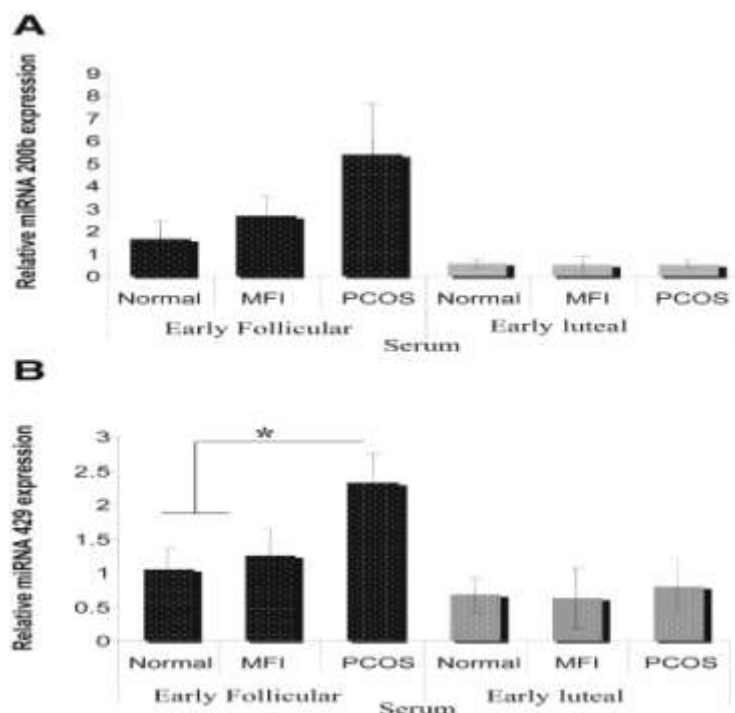
Eisenberg και συν., 2017). Με βάση αυτά τα δεδομένα η Eisenberg και οι συνεργάτες της μελέτησαν τα επίπεδα των miR-429 και miR-200b στο αίμα γυναικών με PCOS καθώς και σε γυναίκες με υπογόνιμους συζύγους, οι οποίες λάμβαναν θεραπεία για εξωσωματική γονιμοποίηση και τα συνέκριναν με φυσιολογικές γόνιμες γυναίκες (Eisenberg και συν., 2017). Όπως προέκυψε, κατά τον φυσιολογικό κύκλο τα επίπεδα των παραπάνω micro RNAs παρουσίαζαν διαφορετικό προφίλ έκφρασης κατά την μετάβαση από την ωοθηλακική στην ωχρινική φάση. (Εικόνα 16)

Αντίθετα, σε γυναίκες με PCOS, πριν την ορμονοθεραπεία, τα επίπεδα των miR-429 και miR-200b ήταν εμφανώς αυξημένα, ειδικά το miR-429 παρουσίαζε σχεδόν διπλάσια επίπεδα στις γυναίκες αυτές. (Εικόνα 17) Τα επίπεδα των micro RNAs παρουσίασαν πτώση σε όλες τις κατηγορίες 36 ώρες μετά την πρόκληση ωορρηξίας είτε φυσιολογικά είτε κατόπιν ορμονικής διέγερσης.



**Εικόνα 16. Τα επίπεδα έκφρασης των miR-429 και miR-200b στον φυσιολογικό κύκλο.**

(Eisenberg I και συν., Elevated circulating micro-ribonucleic acid (miRNA)-200b and miRNA-429 levels in anovulatory women, 2017)



**Εικόνα 17. Τα επίπεδα έκφρασης των miR-429 και miR-200b σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), σε γυναίκες με ωορρηξία σε πρόγραμμα IVF και σε φυσιολογικές γυναίκες.**

(Eisenberg I και συν. Elevated circulating micro-ribonucleic acid (miRNA)-200b and miRNA-429 levels in anovulatory women, 2017)

Με βάση την παραπάνω μελέτη, προτείνεται ότι τα miR-429 και miR-200b ενέχονται στη λειτουργία της ωοθήκης και μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες στον ορό του αίματος για τη διαδικασία της ωορρηξίας (Eisenberg και συν., 2017).

Όπως διαπιστώνεται από όλα τα προηγούμενα, παρόλο που το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών αποτελεί μια διαταραχή με πολλούς διαφορετικούς φαινοτύπους και οι γνώσεις μας σε σχέση με το μηχανισμό δράσης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs στη διαμόρφωση των φαινοτύπων αυτών είναι περιορισμένη, τα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση των ασθενών αυτών. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την εξακρίβωση όλων των παραπάνω, την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη καθώς και το σχεδιασμό πιθανών φαρμάκων με βάση την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους.

### 3.3.2 Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (Premature ovarian failure –POF)

Πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πλάσμα αίματος και ωοθηκικούς ιστούς γυναικών με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, αναγνώρισαν την ύπαρξη μικρών μη κωδικών μορίων RNAs, τα οποία πιθανά σχετίζονται με την ανάπτυξη της ασθένειας. Συνήθως οι μελέτες σε γυναίκες με POF πραγματοποιούνται σε πλάσμα αίματος, δεδομένου ότι στην πλειοψηφία τους δεν παράγουν ωοθηλάκια για τη λήψη ωοθηλακικού υγρού. Ο Dang και οι συνεργάτες του ανέφεραν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-22-3p στο πλάσμα ασθενών με POF σε συγκρινόμενα με υγιείς γυναίκες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην ίδια μελέτη τα μειωμένα αυτά επίπεδα του miR-22-3p συσχετίστηκαν με εκφύλιση των ωοθηκών (Dang και συν., 2015).

Σε μια άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε, κάνοντας χρήση μικροσυστοιχιών miRNA, βρέθηκαν 10 miRNAs με σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης και δύο με χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με φυσιολογικές γυναίκες (Εικόνα 18). Μεταξύ των miRNAs που παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης ήταν και το miR-23a, το οποίο αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της απόπτωσης των κοκκιωδών κυττάρων, εφόσον αναστέλλει την έκφραση του X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) (Virant-Klun και συν., 2015). Το γεγονός αυτό προκαλεί την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και την αυξημένη απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων σε ασθενείς με πρόωρη ωοθηλακική ανεπάρκεια. Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί και η αύξηση του miR-27a, το οποίο παρουσιάζει υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με POF και επιδρά στον παράγοντα ανάπτυξης των ωοθηλακίων IGFBP-2 (Li και συν., 2015). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι τα miR-23a και miR-27a διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραπάνω διαταραχή και αποτελούν πιθανούς διαγνωστικούς βιοδείκτες. Τέλος, έχουν προταθεί τα miR-518 και οι πολυμορφισμοί στα miR-146a, miR-196a και miR-449a ως νέοι παράγοντες προδιάθεσης για POF και πρόωρη εμμηνόπαυση (Li και συν., 2015, Virant-Klun και συν., 2015). (Πίνακας 5)

Η κατανόηση των μηχανισμών μεσολάβησης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs στην απόπτωση των ωοθηλακίων αποτελεί το πρώτο βήμα για την αποσαφήνιση της παθογένεσης στην πρόωρη ωοθηλακική ανεπάρκεια, απαιτούνται όμως περισσότερες μελέτες, τόσο για την καλύτερη αντίληψη των παραπάνω μηχανισμών όσο και για κατασκευή λειτουργικών δικτύων που θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό θεραπευτικών μορίων.



<b>miRNA associated with POI</b>	<b>Function</b>
miR-23a	apoptosis of granulosa cells
miR-27a	apoptosis of granulosa cells oocyte maturation
miR-22-3p	unknown
miR-146a	oocyte apoptosis apoptosis of granulosa cells
miR-196a	unknown
miR-290-295	location of the migrating PGCs
miR-423	unknown
miR-608	unknown

**Πίνακας 5. Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs που σχετίζονται με την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (POF)**

(Ying Guo et al. Role of microRNAs in premature ovarian insufficiency. Reproductive Biology and Endocrinology (2017) 15:38)

### 3.4 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΕΜΒΡΥΟΥ

Η γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο και η δημιουργία του ζυγωτού αποτελούν μονό το πρώτο βήμα για επίτευξη της κύησης. Τα πρώτα στάδια μετά τη γονιμοποίηση, από την αρχική αυλάκωση του ζυγωτού και τη δημιουργία της βλαστοκύστης μέχρι την εμφύτευση του εμβρύου, αποτελούν πολύ κρίσιμους παράγοντες για τη διατήρηση και την εξέλιξη της εγκυμοσύνης. Η αποτυχία της εμφύτευσης είναι ο κυριότερος παράγοντας απώλειας μιας κύησης, σε ποσοστό που αγγίζει το 75%. Η πιθανότητα επίτευξης κύησης σε κάθε έμμηνο κύκλο φτάνει μόλις το 30%, ενώ 1 στα 7 ζευγάρια παγκοσμίως υποφέρει από υπογονιμότητα. Παρόλη τη σημαντική πρόοδο που έχει επιτευχθεί στον τομέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) και της εμβρυομεταφοράς (IVF-ET), τα ποσοστά κύησης για τα ζευγάρια αυτά παραμένουν χαμηλά, κυρίως εξαιτίας της αποτυχίας εμφύτευσης. Για το λόγο αυτό η κατανόηση του φαινομένου της εμβρυϊκής εμφύτευσης αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας Virant-Klun και συν., 2015

Η επιτυχής εμφύτευση του εμβρύου είναι αποτέλεσμα ενός καλά συντονισμένου διαλόγου ανάμεσα σε ένα βιώσιμο έμβρυο και ένα δεκτικό ενδομήτριο, μία διαδικασία κατά την οποία καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν πολλές πρωτεΐνες-κλειδιά και αυξητικοί παράγοντες, όπως οι υποδοχείς προγεστερόνης (PR-A και PR-B) και οιστρογόνων (ERα and ERβ), η Cyclooxygenase-2 (Cox2), ένα σημαντικό ένζυμο της βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης (PG), ο παράγοντας Leukemia inhibitory factor (LIF), μέλος της οικογένειας της ιντερλευκίνης-6 κ.α. όπως φαίνεται στην εικόνα 18 (Cha και συν., 2013). Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs συμμετέχουν επίσης στην παραπάνω διαδικασία, αν και οι γνώσεις μας σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζουν είναι ακόμη περιορισμένες.

### 3.4.1 Τα miRNAs στην ενεργοποίηση της βλαστοκύστης

Για την κατανόηση του μηχανισμού ενεργοποίησης της βλαστοκύστης ιδανικό μοντέλο αποτελεί η καθυστερημένη εμφύτευση στα ποντίκια, όπου η ενεργοποίηση της αδρανούς βλαστοκύστης επιτυγχάνεται με εισαγωγή οιστραδιόλης σε αυτή. Σε συγκριτικές μελέτες των προφίλ έκφρασης ανάμεσα σε αδρανής και ενεργοποιημένες βλαστοκύστες διαπιστώθηκε διαφοροποιημένη έκφραση σε 45 από τα 238 miRNAs που μελετήθηκαν. Μεταξύ αυτών, πέντε από τα εννέα μέλη της οικογένειας let-7 παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης μετά την ενεργοποίηση. Το let-7a φαίνεται ότι τροποποιεί τη δυνατότητα εμφύτευσης της ενεργοποιημένης βλαστοκύστης μέσω της άμεσης επίδρασης στην ιντεγκρίνη-β3. Η οιστραδιόλη επάγει τη μειωμένη έκφραση του let-7 και αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης στόχου του dicer και αυτό το μονοπάτι let-7a/dicer φαίνεται ότι ρυθμίζει το "δυναμικό εμφύτευσης" της βλαστοκύστης στα ποντίκια (Sha και συν., 2011). Σε μελέτες που έγιναν σε βλαστοκύστες γυναικών που παραπέμφθηκαν για εξωσωματική γονιμοποίηση λόγω του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση έξι miRNAs (hsa-let-7a, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-24, hsa-miR-92 και hsa-miR-93) ήταν σημαντικά μειωμένη συγκριτικά τα αντίστοιχα επίπεδα σε βλαστοκύστες από υγιείς δότριες ωαρίων. Η μορφολογία των βλαστοκυστών δε παρουσίαζε διαφοροποίηση (McCallie και συν., 2010). Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως σχετίζεται με το ρόλο των μικρών μη κωδικών μορίων στην ανθρώπινη υπογονιμότητα.

### 3.4.2 Το ενδομήτριο

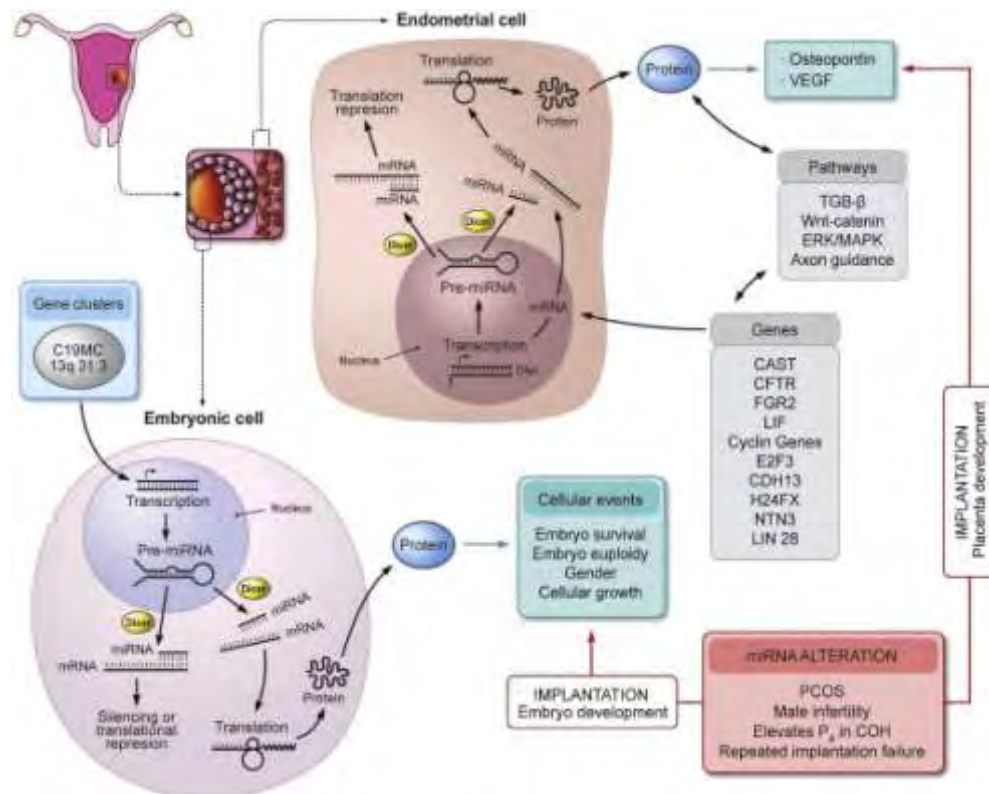
Η δεκτικότητα του ενδομητρίου είναι ένα πολυπλοκο γεγονός το οποίο συμβαίνει κατά τη διάρκεια του μέσου της ωχρινικής φάσης του ενδομητρίου και είναι γνωστό ως παράθυρο εμφύτευσης (window of implantation- WOI) και διαρκεί περίπου από την 20η έως την 24<sup>η</sup> μέρα του έμμηνου κύκλου. Για τη επίτευξη αυτού του φαινομένου μεσολαβούν πολύ παράγοντες, μεταξύ των οποίων αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, λιπίδια και παράγοντες επούλωσης, των οποίων η έκφρασης ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη (Εικόνα 19).

Περίπου 140 γονίδια που εκφράζονται στο ενδομήτριο έχουν συσχετιστεί με αυτό το φαινόμενο, μεταξύ των οποίων τα GPX3, PAEP, LIF κ.α. ενώ είναι γνωστός και ο ρόλος των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs στη ρύθμιση "γονιδίων δεκτικότητας" στο ενδομήτριο ποντικών. Ο Hu και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το γονίδιο Reck, αποτελεί το γονίδιο στόχο του miR-21, το οποίο υπερεκράζεται στα σημεία εμφύτευσης του ενδομητρίου την πέμπτη μέρα της κύησης, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτό το miRNA παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (Hu και συν., 2008).<sup>71</sup> Επιπλέον έχει βρεθεί ότι τα γονίδια της Cyclooxygenase-2 (Cox2), ενός σημαντικού ενζύμου της βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης (PG), το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη διάρκεια της εμφύτευσης ρυθμίζεται στον ποντικό από τα miR-101a και miR-109<sup>a</sup>.

Σε μια άλλη μελέτη, στην οποία απομονώθηκαν κύτταρα από ενδομήτριο γυναικών στην όψιμη εκκριτική φάση του ενδομητρίου (12-14 μέρα του κύκλου) και στην μέση της ωχρινικής φάσης (20-24 μέρα του κύκλου- WOI) και έγινε σύγκριση του προφίλ έκφρασης των miRNAs, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση των miR-30b και miR-30 d και μειωμένη έκφραση των miR-494 και miR-923 (Sha και συν., 2011).

Όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω, τα miRNAs επηρεάζουν ταυτόχρονα τόσο τα εμβρυϊκά όσο και τα κύτταρα του ενδομητρίου. Συγκεκριμένα miRNAs συνθέτονται από το έμβρυο ή από τα κύτταρα του ενδομητρίου και συνδέονται με τα mRNAs-στόχους τους, αναστέλλοντας τη μετάφρασή τους. Με αυτόν τον τρόπο επάγουν κυτταρικά γεγονότα και σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την εμφύτευση του εμβρύου. Όπως έχει αναφερθεί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ανδρική υπογονιμότητα και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η έκφραση των μικρών αυτών μη κωδικών μορίων RNAs

διαφοροποιείται, με αποτέλεσμα να επιδρά στην ικανότητα εμφύτευσης του εμβρύου (Galliano και συν., 2014). (Εικόνα 19)



**Εικόνα 19. Οι μηχανισμοί ρύθμισης των miRNA κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης.**

(Galliano D, Pellicer A: MicroRNA and implantation. Fertil Steril 2014; 101:1531–1544.)

### 3.4.3 Επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (repeated implantation failure -RIF)

Πρόκειται για μια παθολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης εξαιτίας κυρίως της μειωμένης δεκτικότητας του ενδομητρίου. Από μελέτες έκφρασης των miRNAs στο ενδομήτριο γυναικών με RIF και φυσιολογικών γόνιμων γυναικών προέκυψε διαφοροποιημένη έκφραση του miR-22, το οποίο είναι αυξημένο σε γυναίκες με προβλήματα εμφύτευσης. Στα ποντίκια, η αυξημένη έκφραση του miR-22 αναστέλλει την έκφραση του Tiam1 ((T-lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1) και του Rac1 (RasrelatedC3 botulinum toxin substrate 1), επιδρώντας έτσι στην προετοιμασία του ενδομητρίου και την εμφύτευση του εμβρύου. Το miR-145 είναι, επίσης, αυξημένο στο ενδομήτριο γυναικών με RIF. Η υπερέκφραση του miR-145 μπλοκάρει την αλληλεπίδραση του εμβρυικού παράγοντα IGF-I (insulin-like growth factor 1) με τον αντίστοιχο μητρικό υποδοχέα ( IGF-I receptor) κατά την εμφύτευση (Liu και συν., 2011).

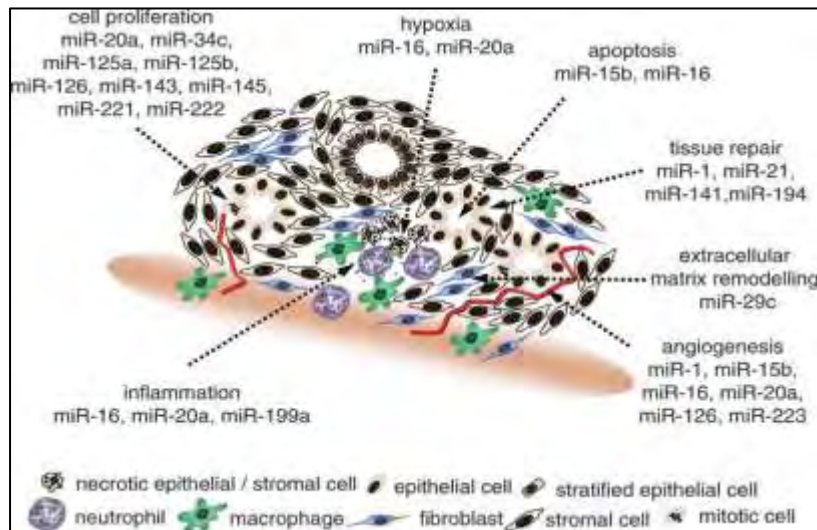
Επίσης, όπως και στην περίπτωση της ανδρικής υπογονιμότητας φαίνεται πως πολυμορφισμοί στα micro RNAs προκαλούν προβλήματα στην πρόσδεση με το mRNA-στόχο με αποτέλεσμα τη μειωμένη δρατικότητα τους. Έτσι, σε μια μελέτη 354 γυναικών από την Κορέα, η οποία περιλάμβανε 120 γυναίκες με επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (RIF), προέκυψε ότι οι πολυμορφισμοί miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2T>C, and miR-499A>G, σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση ανάπτυξης RIF (Roger, 2016).

### 3.4.4 Ενδομητρίωση

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, οι οποίες αφορούν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την παθολογία της ενδομητρίωσης. Τα μονοπάτια αυτά σχετίζονται με την φλεγμονή, αναδιαμόρφωση ιστών, κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση και συνηγορούν στη διαμόρφωση ενός μοντέλου ανάπτυξης αλλοιώσεων του ενδομητρίου, οι οποίες μετατοπίζονται κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρήσεως και μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας και εδραιώνονται σε ένα έκτοπο σημείο (Ohlsson Teague και συν., 2010).

Πολλά μετάγραφα m-RNAs παρουσιάζουν διαφοροποιημένη ρύθμιση στις ενδομητρικές αλλοιώσεις όταν συγκριθούν με ευτοπικούς ιστούς. Παρόλα αυτά *in silico* μελέτες διαπίστωσαν ότι η έκφραση των γονιδίων δεν ρυθμίζεται μόνο στο επίπεδο της μεταγραφής αλλά υπόκεινται και σε μεταμεταφραστικούς μηχανισμούς ρύθμισης. Στους μηχανισμούς αυτούς, ενδεχομένως, περιλαμβάνονται και τα miRNAs, τα οποία παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση σε ενδομητρικές αλλοιώσεις ασθενών με ενδομητρίωση, μεταξύ των οποίων τα miR-15b, miR-16, miR-20a, miR-21, miR-26a, miR-34c κ.α. (Ohlsson Teague και συν., 2010)

Για τον τρόπο με τον οποίο τα miRNA εμπλέκονται στην παθολογία της ενδομητρίωσης έχουν προταθεί κάποια μοντέλα τα οποία φαίνονται στην Εικόνα 20 και αφορούν σε διαδικασίες που περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την φλεγμονή, την υποξία, την απόπτωση, την επιδιόρθωση και αναδιαμόρφωση ιστών.



Εικόνα 20. Οι ρυθμιστικές λειτουργίες των μικρών μη κωδικών μορίων RNA κατά την ανάπτυξη των εκτοπικών αλλοιώσεων στην ενδομητρίωση (E.M. C. Ohlsson Teague και συν.. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. Human Reproduction Update, Vol.16, No.2 pp. 142–165, 2010)

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των ασθενών με ενδομητρίωση είναι η υπογονιμότητα. Οι γυναίκες αυτές παρουσιάζουν μεγαλύτερη ωθηλακική φάση, μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης και μικρότερο μέγεθος ωθηλακίων σε σχέση με γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα. Για το λόγο αυτό, είναι πιθανόν, ότι κατά την ενδομητρίωση, η αλληλουχία των γεγονότων ωρίμανσης του ωοκυττάρου διακόπτεται λόγω της διαφοροποιημένης ρύθμισης από τα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs. Επιπλέον, οι γυναίκες με ενδομητρίωση παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά εμφύτευσης του εμβρύου, γεγονός που συνδέεται με τη σωστή ανάπτυξη του ενδομητρίου και την στερεοειδογένεση, δύο διαδικασίες που σχετίζονται με την ρύθμιση μέσω των miRNAs και επηρεάζονται από τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Επομένως, η χαμηλότερη έκφραση του miR-21, το οποίο έχει βρεθεί ότι συντονίζει τη λειτουργία των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στη μήτρα (Hu και συν., 2008), σε ασθενείς με ενδομητρίωση, ενδεχομένως, σχετίζεται με την ανώμαλη διαμόρφωση του περιβάλλοντος της μήτρας και τη δυσκολία εμφύτευσης του εμβρύου.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι γίνονται προσπάθειες να διαμορφωθεί ένα ημι-επεμβατικό τεστ για τη διάγνωση της ενδομητρίωσης, η οποία μέχρι τώρα διαγιγνώσκεται κυρίως



λαπαροσκοπικά. Η μέθοδος αυτή θα στηρίζεται στην ανάλυση των χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων miRNAs και πρωτεϊνών σε βιοψίες ενδομητρίου, ενώ ιδανικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κυκλοφορούντα miRNAs κάνοντας τη μέθοδο ακόμη πιο φιλική (Ohlsson Teague και συν., 2010).

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπογονιμότητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα του Δυτικού Κόσμου, το οποίο απασχολεί περίπου 1 στα 6 ζευγάρια, με συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά και πολύ σημαντικές κοινωνικοοικονομικές συνέπειες. Αποτελεί εδώ και χρόνια αντικείμενο μελέτης των επιστημόνων και γίνεται προσπάθεια να γίνουν κατανοητοί οι φυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στη σύλληψη και στην επιτυχή έκβαση της κύησης, ενώ παράλληλα επιδιώκεται η ανακάλυψη των αιτιών της μειωμένης γονιμότητας. Η γενετική και η επιγενετική αποτελούν τη βάση των αιτιών για την πλειοψηφία των περιπτώσεων, αν και ένα μεγάλο τμήμα τους δεν έχει ακόμη καθοριστεί. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτά το πεδίο της μεταμεταφραστικής ρύθμισης, με κύριους εκπρόσωπους τα μικρά μη κωδικά μόρια RNAs και τη δράση τους στη σωστή ωρίμανση των άρρενων και θήλεων γαμετών.

Η σπερματογένεση και η ωογένεση αποτελούν δύο εξαιρετικά πολύπλοκες διαδικασίες, οι οποίες ξεκινούν ήδη από την εμβρυική ηλικία και περιλαμβάνουν συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις, καθώς και διαδοχή πολλών σταδίων προκειμένου να διαμορφωθούν οι φυσιολογικοί ώριμοι γαμέτες, οι οποίοι θα έχουν τη δυνατότητα μιας επιτυχούς γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα miRNAs, όπως τα miR-21, miR-125b, let-7a and let-7b, εμπλέκονται σε όλη τη διαδικασία της ωοθηλακικής ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της ωοθηλακικής αύξησης, ατρησίας και ωορρηξίας. Επιπλέον, και στις δυο διαδικασίες περιλαμβάνονται στάδια κατά τα οποία ενώ ο πυρήνας του γαμέτη είναι μεταγραφικά ανενεργός, το κύτταρο εξακολουθεί να επιτελεί λειτουργίες με αυστηρά καθορισμένο χρονοδιάγραμμα (π.χ. η υπερσυσπεικνωμένη χρωματίνη στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων). Οι παραπάνω βιολογικές διεργασίες φαίνεται ότι ρυθμίζονται μέσω της δράσης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs.

Τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs σε κάθε στάδιο φαίνεται ότι είναι συγκεκριμένα, ενώ διαφοροποιήσεις στο προφίλ έκφρασης τους έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις

τόσο στους άνδρες, όπως τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης miR-34-3p σε ολιγοσπερμικούς ασθενείς, όσο και στις γυναίκες, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα υψηλά επίπεδα των miR-23a και miR-27a σε ασθενείς με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια.

Η παρατήρηση ότι τα miRNAs παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα, εξαιτίας της πρόσδεσής τους στις πρωτεΐνες Αργοναύτες, τόσο σε παραφινολοποιημένους ιστούς όσο και στο περιφερικό αίμα ασθενών, ανέδειξε την πιθανότητα η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των μορίων αυτών να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον καθορισμό των διαφόρων ασθενειών. Αυτό έχει ήδη επιτευχθεί σε ασθένειες όπως ο καρκίνος αλλά γίνεται προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και στην υπογονιμότητα. Έτσι σε ό, τι αφορά την ανδρική υπογονιμότητα τα παρακάτω miRNAs θα μπορούσαν αποτελέσουν βιοδείκτες: το miR-34-3p για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία και μη αποφρακτική αζωοσπερμία, το miR-7a2 στην περίπτωση του υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού, το miR-155, σε συνδυασμό με τα επίπεδα της FSH στον ορό αίματος, ως βιοδείκτης για την ανίχνευση της ανδρικής υπογονιμότητας. Αντίστοιχα στις γυναίκες :τα miR-222, miR-146a, miR-30c θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτες σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, τα miR-429 και miR-200b ενέχονται στη λειτουργία της ωοθήκης και θα χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες στον ορό του αίματος για την ανίχνευση της διαδικασίας της ωορρηξίας, τα miR-23a και miR-27a στη διάγνωση της πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας, το miR-22 σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης και τα τα miR-15b, miR-16, miR-20a, miR-21, miR-26a, miR-34c για την ημι-επεμβατική διάγνωση της ενδομητρίωσης.

Παρόλο που πολλά δεδομένα υποστηρίζουν τα προηγούμενα, πολλές ακόμη μελέτες μένουν να πραγματοποιηθούν προκειμένου να εξακριβωθεί η διαγνωστική αξία των παραπάνω δεικτών και ακόμη περισσότερες προκειμένου να σχεδιαστούν θεραπευτικά μόρια, τα οποία θα στοχεύουν στην επαναφορά των φυσιολογικών προφίλ έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων RNAs και στην θεραπεία παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με την υπογονιμότητα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, Keller A, Lubbad AM, Hammadeh M, et al. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril*. 2014;101:78–86.e2

Ahmed K... Latreille M., Stoffel M. Loss of microRNA-7a2 induces hypogonadotropic hypogonadism and infertility *J Clin Invest*. 2017;127(3):1061-1074

Ajay Francis Christopher, Raman Preet Kaur, [...], and Parveen Bansal. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res*. 2016 Apr-Jun; 7(2): 68–74

Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*. 2015;519:482–5

Ambros V., B. Bartel, D.P. Bartel, C.B. Burge, J.C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun, T. Tuschl, A uniform system for microRNA annotation, *RNA-Publ. RNA Soc*. 9 (2003) 277–279.

Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116, 281-97 (2004)

Boissière A, A. Gala, A. Ferrières-Hoa, T. Mullet, S. Baillet, A. Petiton, A. Torre and S. Hamamah. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility. *Basic and Clinical Andrology* (2017) 27:7

Borghese B, Santulli P, Hequet D, Pierre G, de Ziegler D, Vaiman D, et al. Genetic polymorphisms of DNMT3L involved in hypermethylation of chromosomal ends are associated with greater risk of developing ovarian endometriosis. *Am J Pathol* 2012;180: 1781-6.

Brinkmann AO. Molecular mechanisms of androgen action--a historical perspective. *Methods Mol Biol*. 2011; 776:3-24

Burnett John C. and Rossi John J. RNA-based Therapeutics- Current Progress and Future Prospects. *Chem Biol*. 2012 January 27; 19(1): 60–71.

Cha J, Vilella F, Dey SK, Simon C. Molecular interplay in successful implantation. In: Sanders S, editor. *Ten critical topics in reproductive medicine*. Washington, DC: Science/AAAS; 2013:44–8.

Chen Xiaoxu, Xueliang Li, Jiayin Guo, Pengfei Zhang and Wenxian Zeng\*. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2017) 8:35

Chendrimada T.P., R.I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, R. Shiekhattar, TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436 (2005) 740–744.

Christensen A, Bentley GE, Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu TJ, et al. Hormonal regulation of female reproduction. *Horm Metab Res* 2012;44:587–91.

Creemers Esther E., Anke J. Tijssen and Yigal M. Pinto .Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease?. *Circ Res*. 2012;110:483-495

Cui L, Fang L, Shi B, Qiu S, Ye Y. Spermatozoa micro ribonucleic acid–34c level is correlated with intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril*. 2015;104:312–317.e1

Dai LS, Tsai-Morris CH, Sato H, Villar J, Kang JH, Zhang JB, et al. Testis specific miRNA-469 Up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem*. 2011;286:44306–18.

Dang Y, Zhao S, Qin Y, Han T, Li W, Chen ZJ. MicroRNA-22-3p is down-regulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure *Fertil Steril*. 2015 Mar;103(3):802-7

Eisenberg I, Nahmias N.,Novoselsky Persky M, Greenfield C, Goldman-Wohl D,...S. Yagel and Tal Imbar. Elevated circulating micro-ribonucleic acid (miRNA)-200b and miRNA-429 levels in anovulatory women. Volume 107, Issue 1, Pages 269–275January 2017

Fiddler SD, Carletti MZ, Hong X, Christenson LK. Hormonal regulation of micro RNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod* 2008; 79:1030-7.

Galliano D, Pellicer A: MicroRNA and implantation. *Fertil Steril* 2014; 101:1531–1544.

Gardner RJM and Sutherland GR. Chromosomal abnormalities and genetic counseling. 4<sup>th</sup> Edition. Oxford University Press 2004

Giannouli Stamatina, Panagiotis Maragozidis, Konstantinos I. Gourgoulisanis and Nikolaos A.A. Balatsos. MicroRNAs: From Regulators of Gene Expression to Cancer Biomarkers, Chapter 8. In: *Cancer Biomarkers*, CRC Press,1st edition (2012)

Gou Lan-Tao, Peng Dai, Mo-Fang Liu. Small noncoding RNAs and male infertility. Wiley & Sons November/December 2014, 5: 733-745

Gunes S., Mehmet A. Arslan , G. N. T. Hekim,R. Asci. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet* (2016) 33:553–569

Hasuwa Hidetoshi, Jun Ueda, Masahito Ikawa, Masaru Okabe MiR-200b and miR-429 Function in Mouse Ovulation and Are Essential for Female Fertility. *Science* 05 Jul 2013: Vol. 341, Issue 6141, pp. 71-73

Havens, M.A., A.A. Reich, D.M. Duelli and M.L. Hastings. 2012. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res*. 40: 4626-4640

Hossain, M.M.; Cao, M.; Wang, Q.; Kim, J.Y.; Schellander, K.; Tesfaye, D.; Tsang, B.K. Altered expression of miRNAs in a dihydrotestosterone-induced rat PCOS model. *J. Ovarian Res.*2013,6, 36.

Hu SJ, Ren G, Liu JL, Zhao ZA, Yu YS, Su RW, Ma XH, Ni H, Lei W, Yang ZM. MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *J Biol Chem* 2008;283:23473–23484.

Hart Roger. PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF FEMALE FERTILITY: ROLE OF THE ENVIRONMENT, MODERN LIFESTYLE, AND GENETICS *Physiol Rev* 96: 873–909, 2016

Hydbring P, Badalian-Very G (2013) Clinical applications of microRNAs [v3; ref status: indexed, <http://f1000r.es/218>] *F1000Research* 2013, 2:136 (doi: 10.12688/f1000research.2-136.v3)

Imbar Tal, Eisenberg Iris. Fertility and Sterility, 2014, vol 101, no 6:1524-1530

Jefferson WN, Chevalier DM, Phelps JY, Cantor AM, Padilla-Banks E, Newbold RR, et al. Persistently altered epigenetic marks in the mouse uterus after neonatal estrogen exposure. *Mol Endocrinol* 2013;27:1666-77

Johnson Martin H. & Everitt Barry J. Essential Reproduction.. Fifth Edition, 2000

Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of micro RNA- mediated gene silencing. *Nature Reviews. Genetics*; London 16.7 (Jul 2015): 421-433.

Kim GJ, Georg I, Scherthan H, Merckenschlager M, Guillou F, Scherer G, et al. Dicer is required for Sertoli cell function and survival. *Int J Dev Biol.* 2010;54:867–75

Kim V.N., J. Han, M.C. Siomi, Biogenesis of small RNAs in animals, *Nat. Rev. Mol. Biol.* 10 (2009) 126–139

Kleene KC. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res.* 2003;103:217–24.

Kumar N, Srivastava S, Burek M, Forster CY, Roy P. Assessment of estradiol induced gene regulation and proliferation in an immortalized mouse immature Sertoli cell line. *Life Sci.* 2016; 148:268–78.

Layman L.C..The genetic basis of female reproductive disorders: Etiology and clinical testing . *Mol Cell Endocrinol.* 2013 May 6; 370(0): 138–148

Li Ying, Ying Fang, Ying Liu and Xiaokui Yang. MicroRNAs in ovarian function and disorders. *Journal of Ovarian Research* (2015) 8:51

Li Z., Zheng, Z., Ruan, J., Li, Z., Zhuang, X., & Tzeng, C.-M. (2016). Integrated analysis miRNA and mRNA profiling in patients with severe oligozoospermia reveals miR-34c-3p downregulates PLCXD3 expression. *Oncotarget*, 7(33), 52781–52796.

Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2009;7:13

Liu Chang-Gong, G. Calin, Stefano Volinia & Carlo M Croce. MicroRNA expression profiling using microarrays *Nature Protocols* 3, 563 - 578 (2008)

Liu WM, Pang RTK, Chiu PCN, Wong BPC, Lao KQ, Lee KF, et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:490–4

Liu W, Niu Z, Li Q, Pang RTK, Chiu PCN, Yeung WSB. MicroRNA and embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 263–271

Lu J, Gu H, Tang Q, et al. Common SNP in hsa-miR-196a-2 increases hsa-miR-196a-5p expression and predisposes to idiopathic male infertility in Chinese Han population. *Scientific Reports*. 2016;6:19825

Lund E, S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg, U. Kutay, Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303 (2004) 95–98

McBride D, Carre W, Sontakke SD, Hogg CO, Law A, Donadeu FX, et al. Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. *Reproduction*. 2012;144:221–33

McCallie, B.; Schoolcraft, W.B.; Katz-Jaffe, M.G. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil. Steril.* 2010, 93, 2374–2382.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.*: Circulating microRNAs as stable blood based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(30): 10513–8.

Munoz X., Mata A., Bassas L., Larriba S. Altered miRNA signature of developing germ cells in infertile patients relates to the severity of spermatogenic failure and persists in spermatozoa. *Nature Scientific Reports* (2015), 5:17991

Nicholls PK, Harrison CA, Walton KL, McLachlan RI, O'Donnell L, Stanton PG. Hormonal regulation of sertoli cell micro-RNAs at spermiation. *Endocrinology*. 2011; 152:1670–83

Ohlsson Teague E.M. C., C. G. Print, and M. L. Hull The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Human Reproduction Update*, Vol.16, No.2 pp. 142–165, 2010

Papaiouannou MD, Nef S. MicroRnas in the testis: building up male fertility. *J Androl* 2010, 31:26-33

Petersen, C.P., M.E. Bordeleau, J. Pelletier and P.A. Sharp. 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 21: 533-542.

Poongothai J, Gopenath T S, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009; 50(4) : 342

Reinhart B.J, F.J. Slack, M. Basson, J.C. Bettinger, A.E. Pasquinelli, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, G. Ruvkun, The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 403 (2000) 901–906.

Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Godo A, Grossmann M, Pons MC, et al. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. *Fertil Steril*. 2015;104:591–60

Sang Q., Yao Z, Wang H, Feng R, Zhao X. Xing Q et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of MicroRnas that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3068-62

Sha AG, Liu JL, Jiang XM, Ren JZ, Ma CH, Lei W, et al. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil Steril* 2011;96:150–155.e5.

Shukla S, Sumaria CS, Pradeepkumar PI: Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem*.2010; 5(3): 328–49.

Song J.J., S.K. Smith, G.J. Hannon and L. Joshua-Tor. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305: 1434–1437

Song YN, Shi LL, Liu ZQ, Qiu GF. Global analysis of the ovarian microRNA transcriptome: implication for miR-2 and miR-133 regulation of oocyte meiosis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea:Decapoda). *BMC Genomics*. 2014;15:547.

Sørensen , M. L. Wissing , S. Salö , A. Mikkelsen Englund , L.Torp Dalgaard. MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) *Genes* 2014, 5, 684–708

Tahmasbpour e., Balasubramanian D., Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility:gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet* (2014) 31:1115–1137

Tang D, Huang Y, Liu W, Zhang X. Up-regulation of microRNA-210 is associated with spermatogenesis by targeting IGF2 in male infertility. *Med Sci Monit*. 2016;22:2905–10.

Tang F., Kaneda M, O' Caroll D., Hajkova P., Barton SC, Sun YA. Maternal microRnas are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007;21;644-8

Timoneda O, Balcells I, Cordoba S, Castello A, Sanchez A. Determination of reference microRNAs for relative quantification in porcine tissues. *PLoS ONE*. 2012;7, e44413

Tsatsanis C., J. Bobjer, H. Rastkhani, E. Dermitzaki, M. Katrinaki, A. N. Margioris, Y. Lundberg Giwerzman, A. Giwerzman; Serum miR-155 as a potential biomarker of male fertility, *Human Reproduction*, Volume 30, Issue 4, 1 April 2015, Pages 853–860

Virant-Klun Irma, Anders Ståhlberg, Mikael Kubista, and Thomas Skutella. MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells and Stem Cells to Cancer in Humans. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3984937. doi: 10.1155/2016/3984937. Epub 2015 Nov 9

Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al.: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7): 2257–61

Vogt PH, et al. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5933–943

Wahid Fazli, Adeeb Shehzad, Taous Khan, You Young Kim. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803 (2010) 1231–1243

Wang Jin, Jinyun Chen, Subrata Sen. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell. Physiol*. 231: 25–30, 2016

Yang QE, Oatley JM. Spermatogonial stem cell functions in physiological and pathological conditions. *Curr Top Dev Biol*. 2014; 107:235–67.

Yao N, Yang BQ, Liu Y, Tan XY, Lu CL, Yuan XH, Follicle stimulating hormone regulation of microrna expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells. *Endocrine* 2010;38:158-66

Yu ZR, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod.* 2005;73:427–33

Zhang H, Liu Y, Su D, Bai J et al, A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 2011;96(1):34-39

Zhang Shuang , Haiyan Lin , Shuangbo Kong, Shumin Wang, Hongmei Wang, Haibin Wang, and D. Randall Armant. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med.* 2013 October ; 34(5): 939–980